

# Primjena 3D staničnih kultura u istraživanju plućnih bolesti

---

**Kovačić, Antonija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:754177>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Antonija Kovačić**

**Primjena 3D staničnih kultura u istraživanju  
plućnih bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura.

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura na prihvaćanju moje molbe za mentorstvom te uloženom vremenu i stručnom vodstvu.*

*Posebno se želim zahvaliti svojoj prijateljici Adriani koja je samnom prolazila svaki pad i slavila svaki uspjeh. Hvala sestrični Jeleni na dnevnoj dozi smijeha i motivacije. Zahvaljujem se svim kolegama i prijateljima koji su bili dio ove priče, učinili ste moje studentske dane nezaboravnima.*

*S mnogo ljubavi i zahvalnosti ovaj rad posvećujem svojim roditeljima, baki Brankici i Marici. Hvala vam na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci koju ste mi dali tijekom studiranja, zbog vas sam danas tu.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. KULTURA STANICA.....	1
1.2. TRODIMENZIONALNA (3D) KULTURA STANICA .....	2
1.3. USPOREDBA 2D I 3D STANIČNIH KULTURA.....	3
1.4. PLUĆNE BOLESTI .....	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	6
3. MATERIJALI I METODE .....	8
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	9
4.1. METODE UZGOJA 3D KULTURA .....	9
4.2. METODE UZGOJA NA MATRICAMA .....	10
4.2.1. Hidrogelovi .....	10
4.2.2. Organoidi .....	10
4.3. METODE UZGOJA BEZ MATRICA .....	12
4.3.1. Metoda viseće kapljice.....	12
4.3.2. Magnetska levitacija .....	12
4.4. 3D BIOPRINTING .....	13
4.5. „PLUĆA NA ČIPU“ .....	13
4.6. 3D MODELI U ISTRAŽIVANJU PLUĆNIH BOLESTI.....	15
4.6.1. Granica medij-zrak.....	18
4.6.2. Stanični sferoidi .....	19
4.6.3. Ograničenja 3D modela u istraživanjima.....	20
4.7. PRIMJENA U ISTRAŽIVANJU PLUĆNIH BOLESTI.....	21
4.7.1. Tumor pluća .....	21
4.7.2. Kronična opstruktivna plućna bolest .....	24

4.7.3. Astma .....	26
4.7.4. Cistična fibroza .....	28
4.7.5. COVID-19.....	31
5. ZAKLJUČCI.....	34
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	36
7. LITERATURA.....	38
8. SAŽETAK / SUMMARY .....	44
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. KULTURA STANICA

Kultivacija stanica je proces kojim se stanice uzgajaju na hranidbenim podlogama u kontroliranim uvjetima. Stanične kulture važan su i neprocjenjiv materijal za proučavanje i temeljna istraživanja te nezamjenjiv alat kojim se otkrivaju temeljni biofizički i biomolekularni mehanizmi kojima se stanice okupljaju u tkiva i organe. Pomoću njih otkrivamo kako ta tkiva funkcioniraju i kako se ta funkcija mijenja uslijed patološkog procesa (Duval i sur., 2017). Izvrstan su model za otkrivanje i ispitivanje utjecaja lijekova te proučavanje karcinogeneze i mutageneze (Jensen i Teng, 2020).

*In vitro* testovi na stanicama uključuju ispitivanja na primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa. Razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama što je bilo potaknuto znanstvenim, a naročito etičkim razlozima. U laboratorijima koji provode ispitivanja na pokusnim laboratorijskim životinjama nastoji se primjenjivati „3R pristup“ (engl. *Reduce, Refine, Replace*) kojim se, zbog patnje i boli, želi smanjiti broj životinja koje se koriste za ispitivanja te se sugerira da se testovi na životinjama zamijene alternativnim *in vitro* testovima gdje god je moguće (Radojčić Redovnikovići i sur., 2016).

Kulture stanica započinju usitnjavanjem tkiva tako da se dobije suspenzija stanica koja se zatim stavlja u posudicu za kulturu s hranjivim medijem (Cooper i Hausman, 2004). Stanice rastu u inkubatoru u mediju koji sadrži potrebne hranjive tvari, čimbenike rasta i hormone. Kulture se čuvaju u posebnim posudama u strogo kontroliranim temperaturnim uvjetima, obično na 37 °C, uz 5 % CO<sub>2</sub> i 95 % vlažnosti zraka (Białkowska i sur., 2020). Većina tipova animalnih stanica, kao što su fibroblasti i epitelne stanice, prihvaćaju se za dno površine posudice i na njoj rastu. Inicijalno uspostavljene stanične kulture zovu se primarne stanične kulture. Stanice u primarnoj kulturi rastu dok ne prekriju površinu dna posudice u kojoj se nalaze. Nakon toga, stanice se mogu izvaditi iz posudice i u razrijeđenoj koncentraciji ponovno nasaditi što predstavlja sekundarnu kulturu. Taj proces presađivanja može se ponoviti mnogo puta, no većina normalnih stanica u kulturi ne može beskonačno rasti. Na primjer, normalni fibroblasti čovjeka mogu se podijeliti 50 do 100 puta nakon čega prestaju rasti i ugibaju. Nasuprot tome, embrionalne matične stanice kao i stanice tumorskoga podrijetla u kulturi imaju sposobnost neograničene proliferacije pa takve kulture nazivamo permanentnima (Cooper i Hausman, 2004).

S obzirom na način rasta kulture stanica, dijelimo ih na adherentne i suspenzijske stanične linije. Adherentne stanične linije rastu u jednom sloju na umjetnoj podlozi, dok one koje slobodno plutaju u mediju nazivamo suspenzijskim (Bradarić, 2020).

Stanice su pričvršćene na ravnu podlogu od stakla ili plastike, uglavnom u dvije dimenzije kao monoslojevi pa se većina stanica uzgaja dvodimenzionalnim (2D) metodama (Jensen i Teng, 2020). Zbog ograničenja 2D modela, važan napredak u tehnikama stanične kulture bio je uvođenje trodimenzionalnih (3D) modela kultura stanica koje su se pokazale bližima prirodnim sustavima *in vivo* (Ravi i sur., 2015).

## **1.2. TRODIMENZIONALNA (3D) KULTURA STANICA**

Sve stanice u tijelu žive u 3D okruženju koje je ključno za njihov metabolizam i rast. Fenotip i funkcije svake stanice ovise o interakcijama sa susjednim stanicama, izvanstaničnom matriksu i proteinima (Białkowska i sur., 2020).

Trodimenzionalna kultura stanica, skraćeno 3D kultura, je kultura kojom se poboljšavaju uvjeti rasta stanica u staničnoj kulturi na način da im se omogućuje interakcija s međustaničnim tvarima pa na taj način dolazi do poboljšavanja staničnih interakcija (engl. "*cell - to cell*") i unutarstanične signalizacije (Bradarić, 2020). Trodimenzionalna tehnologija kulture stanica je nova tehnologija kulture stanica koja može simulirati rast stanica *in vivo* pomoću trodimenzionalnih matrica (engl. *scaffold*) ili posebnih uređaja, a stanice mogu formirati tkiva ili organe *in vitro*. Godine 1952. Aron Moscona izveo je klasičan eksperiment što je na kraju dovelo do današnjih 3D modela kultura. Moscona je koristio tripsin za odvajanje stanica iz embrionalnih organa pilića, a zatim smjestio stanice u bliski kontakt. Disocirane stanice su se reagrirale kako bi formirale strukture koje odražavaju izvorno tkivo iz kojeg su odvojene. Ova vrsta kulture, gdje se stanice iz više loza spajaju kako bi rekapitulirale izvorno tkivo, naziva se organotipska kultura (Capes-Davis i Freshney, 2021). Značajan napredak modeliranja stanica bila je studija koja je pokazala da se pojedinačne matične stanice izolirane iz kripte tankog crijeva odraslih miševa mogu uzgajati i održavati u 3D kulturama u kojima su regenerirale crijevnu nišu koja se sastojala od struktura sličnih resicama i potpuno diferenciranih epitelnih stanica. Od tada se upotreba tkivnih 3D organoida u istraživanju modeliranja bolesti brzo proširila (Bosáková i sur., 2022).

Zbog svojih prednosti naširoko se koristi u medicinskim istraživanjima, uključujući istraživanje ponašanja samih stanica, njihove diferencijacije, migracije, invazije i mikrookruženja. Velik utjecaj imaju u proučavanju patoloških procesa koji se zbivaju u stanicama uslijed raznih bolesti

kao i u ispitivanju lijekova i terapijskih mogućnosti kod pacijenata (Chen i Wang, 2020). 3D modeli su doista kulture tkiva u svim značenjima tog pojma - organoidne kulture razvijaju složene strukture koje odražavaju ponašanje tkiva unutar izvornog živog organizma (Capes-Davis i Freshney, 2021).

### 1.3. USPOREDBA 2D I 3D STANIČNIH KULTURA

Prije pojave 3D metoda kulture tkiva, mnoge studije koristile su ljudske primarne stanice i stanične linije izvedene iz zdravih ili tumorskih tkiva, uzgojene u jednoslojnim kulturama u dvije dimenzije (Bosáková i sur., 2022). Kultura stanica u dvije dimenzije rutinski se i marljivo provodi u tisućama laboratorija diljem svijeta u posljednja četiri desetljeća, ali kao takva je primitivna i ne reproducira anatomiju i fiziologiju tkiva. Stvaranje stanica u tri dimenzije je relevantnije, ali pak zahtijeva multidisciplinarni pristup i stručnost (Haycock, 2011). Razmotrit ćemo različite aspekte 2D i 3D kultura, glavne prednosti i nedostatke obje metode.

#### 2D kulture stanica

Oblik stanica 2D staničnih kultura je ravan i izdužen jer stanice mogu rasti i širiti se samo dvodimenzionalno u prostoru, a rastu u jednom sloju na podlozi. Sve stanice u kulturi dobivaju jednaku količinu hranjivih tvari i čimbenika rasta iz medija pa su sve stanice u istoj fazi staničnog ciklusa. Prilikom proučavanja utjecaja lijekova na ovim kulturama, stanice često imaju malu otpornost na lijekove te lijekovi mogu vrlo lako izazvati apoptozu u stanicama (Jensen i Teng, 2020). 2D modeli idealni su za visokoučinkoviti probir lijekova, a njihovo generiranje iz staničnih linija s histološkim i genetskim promjenama omogućuje modeliranje različitih kliničkih stanja i odgovora na lijekove. Važna otkrića napravljena korištenjem 2D modela su primjerice spektar mutacija gena *TP53* (engl. *tumor protein P53*) kod raka pluća, mehanizmi otpornosti u *EGFR* (engl. *epidermal growth factor receptor*) mutiranim stanicama, opis *BRAF* (engl. *B-Raf protooncogene*) mutacija u različitim tumorima, uključujući i tumore pluća (Bosáková i sur., 2022).

Iako je njihovo korištenje učestalo i puno jeftinije od korištenja 3D modela, prate ih mnogi nedostaci. Diferencijacija stanica je slaba, razmnožavanje neprirodno brzo, ekspresije gena i proteina često se znatno razlikuju u usporedbi s *in vivo* modelima pa daju netočan prikaz stanica



*in vitro* u odnosu na ponašanje stanica u organizmu (Jensen i Teng, 2020). 2D stanične kulture ograničene su količinom izvanstaničnog matriksa u kulturi i njihovom nesposobnošću da repliciraju morfologiju i strukturne značajke nekog organa, primjerice pluća (Bosáková i sur., 2022).

### **3D kulture stanica**

Prirodni oblik stanice je očuvan, a stanice rastu u trodimenzionalne agregate/sferoide u više slojeva. Hranjive tvari ne moraju biti ravnomjerno raspodijeljene među svim stanicama pa jezgre često ostaju neaktivne jer primaju manje kisika i čimbenika rasta iz medija. Ovaj proces nalikuje jezgri stanica u tumorskim stanicama što omogućuje oponašanje strukture i ponašanja tumorske stanice *in vivo*. Stanice međusobno mogu komunicirati putem izmjene iona i molekula i dobro su diferencirane. Imaju veću otpornost na lijekove te daju točan i realan prikaz učinaka i metabolizma lijekova. Ekspresije gena i proteina slične su kao u stanicama *in vivo*. Korištenjem ovih modela, smanjuje se potreba za korištenjem životinjskih modela jer su smanjene razlike između *in vitro* i *in vivo* sustava (Jensen i Teng, 2020). Iako 3D modeli imaju mnoge prednosti u usporedbi s konvencionalnim 2D modelima, mnogi još uvijek ne uspijevaju u potpunosti prikazati dio dinamičkih značajki ljudskih organa, kao što su npr. procesi izmjene hranjivih tvari i plinova u plućima ili mehaničke sile koje stvaraju pokreti disanja (Bosáková i sur., 2022). Obično su skuplje od 2D kulture stanica i zahtijevaju više vremena, a može biti teško ponoviti eksperimente te protumačiti podatke i dobivene rezultate (Jensen i Teng, 2020).

I 2D i 3D stanične kulture su potrebne za napredovanje istraživanja. Pokazalo se da tradicionalne metode rasta stanica u dvije dimenzije mogu biti nedostatne za nove izazove stanične biologije i biokemije, kao i u farmaceutskim ispitivanjima (Lee i sur., 2008).

3D stanična kultura je dokazala da ima potencijal potpuno promijeniti način na koji se testiraju novi lijekovi, modeliraju bolesti, koriste matične stanice i transplantiraju organi. Prednosti uzgoja 3D stanica su superiornije u odnosu na 2D uzgoj stanica pa i njihova primjena postaje uobičajenija. Kako se tehnike tkivnog inženjstva budu poboljšavale, poboljšavat će se i modeli tumora, terapije i metodologije testiranja bolesti (Jensen i Teng, 2020).

## 1.4. PLUĆNE BOLESTI

Plućne bolesti su vrsta bolesti koje zahvaćaju pluća i druge dijelove dišnog sustava. Mogu biti uzrokovane infekcijom, pušenjem, udisanjem radona, azbesta ili drugih oblika onečišćenja zraka ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

Postoji veliki broj plućnih bolesti, a neke od najčešćih su: pneumonija koja je uzrokovana infekcijom bakterijama, virusima ili gljivicama; kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) koja uzrokuje suženje dišnih puteva, a najčešći uzrok je pušenje cigareta; astma koja uključuje kroničnu upalu dišnih puteva pa dovodi do suženja i oticanja dišnih puteva; tuberkuloza koju uzrokuje *Mycobacterium tuberculosis* te zloćudni tumor pluća koji se razvija u plućnom tkivu. Uključuju i intersticijske plućne bolesti poput plućne fibroze koja utječe na intersticijsko tkivo što dovodi do oštećenja plućnog tkiva, otežavajući razmjenu kisika i ugljikovog dioksida. Infekcije donjeg dišnog sustava, KOPB, rak pluća i tuberkuloza spadaju među deset najčešćih uzroka smrti u svijetu. Bolesti poput astme također pogađaju milijune ljudi diljem svijeta i pokazuju sve veću prevalenciju. Iako se smrtnost od astme smanjila tijekom posljednjih desetljeća, nije dostupna nikakva kurativna terapija, a osobna ograničenja u svakodnevnim životnim aktivnostima i dalje postoje (Zscheppang i sur., 2018). Epitelne stanice dišnih puteva služe kao prva linija obrane protiv napada patogena ili upalnih podražaja. U skladu s tim, 3D modeli pluća poput organoida i sferoida su iskorišteni za razumijevanje kako funkcija/disfunkcija epitelnih stanica doprinosi patogenezi raznih upalnih plućnih bolesti i infekcija (Bosáková i sur, 2022).

Ovaj diplomski rad sadrži pregled zahtjeva i postignuća u istraživanju patogeneze i terapijskih mogućnosti navedenih plućnih bolesti koristeći 3D kulture.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Razvoj kultivacije stanica omogućuje sve veću upotrebu primarnog ljudskog tkiva i stanica za modeliranje bolesti potičući razumijevanje ljudskih plućnih bolesti uz smanjenje upotrebe životinja u biomedicinskim istraživanjima (Zscheppang i sur., 2018). U prošlosti su primjenjivani različiti modeli, od *in vitro* modela plućnih stanica do *in vivo* pokusa na životinjama. U ovom području istraživanja često se koriste životinjski modeli budući da svim modelima stanica nedostaje aspekt anatomije ili fiziologije pluća (Baldassi i sur., 2021). Nedavne studije pokazale su da se ljudska pluća značajno razlikuju od mišjih modela u anatomiji, u nekoliko ključnih metaboličkih procesa kao i molekularnim putevima koji reguliraju razvoj i funkciju izvanstaničnog matriksa pluća (Bosáková i sur., 2022). Na primjer, miševi imaju samo 6-8 razina grananja dišnih puteva dok ljudi imaju do 20 ili više. Također nemaju respiratorne bronhiole usporedive s ljudskim. Imaju samo kratke terminalne bronhiole koje se otvaraju ravno u alveolarne duktule. Stoga se tumačenje podataka izvedenih iz modela glodavaca ne može lako prevesti u ljudski kontekst. Ove su ključne činjenice potaknule razvoj alternativnih *in vitro* metoda kulture stanica usmjerenih na oponašanje respiratornog trakta (Baldassi i sur., 2021). Budući da postoje velike fiziološke razlike između većine životinjskih pluća i ljudskih pluća, a životinjski modeli ne mogu u potpunosti rekapitulirati ljudsku bolest, trodimenzionalni (3D) modeli stanica potrebni su i korisni za razumijevanje temeljnih molekularnih i staničnih mehanizama u plućnim bolestima (Zscheppang i sur., 2018). Trodimenzionalne stanične kulture naširoko se koriste u istraživanjima tumora, interakcije i diferencijacije stanica, procjene toksičnosti tvari i učinkovitosti potencijalnih lijekova te stoga obećavaju popunjavanje praznine između 2D uzgoja i eksperimenata na životinjama (Białkowska i sur., 2020). Uzgoj stanica kao trodimenzionalnih modela analogniji je njihovom postojanju *in vivo*, moguće ih je ko-kultivirati s drugim stanicama i staničnim komponentama koje se prirodno pojavljuju u njihovom mikrokruženju što je klinički relevantno (Breslin i O'Driscoll, 2013). Uzevši sve zajedno, postoji veliki globalni teret plućnih bolesti u rasponu od ekonomske do individualne razine, a preduvjet za razumijevanje ovih bolesti i prepoznavanje novih opcija liječenja je stvaranje i validacija složenijih modela poput 3D modela koji bolje oponašaju fiziološka tkiva (Zscheppang i sur., 2018).

Stoga hipoteza ovog preglednog diplomskog rada jest da primjena 3D staničnih kultura u istraživanju plućnih bolesti otvara nove perspektive za razumijevanje, dijagnostiku i liječenje ovih kompleksnih bolesti.

Specifični ciljevi bili su:

- istražiti metode uzgoja 3D kulture stanica;
- ukazati na važnost i prednosti korištenja 3D staničnih kultura u odnosu na 2D stanične kulture i životinjske modele;
- objasniti primjenu 3D staničnih kultura za razumijevanje patologije, dijagnostiku i istraživanje terapijskih mogućnosti u liječenju plućnih bolesti;
- obuhvatiti aktualne rezultate istraživanja tumora pluća, kronične opstruktivske plućne bolesti, astme, cistične fibroze i bolesti COVID-19 dobivene primjenom 3D staničnih kultura.

### 3. MATERIJALI I METODE

Prilikom izrade ovog preglednog diplomskog rada proučavani su i korišteni brojni znanstveni radovi bibliografskih baza podataka kao što su PubMed, ScienceDirect i Hrčak. Baze su pretraživane prema ključnim riječima na engleskom jeziku: *3D cell culture*, *2D cell culture*, *organoids*, *spheroids*, *3D cell culture methods*, *air-liquid interface*, *lung on a chip*, *pulmonary disease*, *lung cancer*, *chronic obstructive lung disease*, *asthma*, *cystic fibrosis*, *COVID-19*. Korišteni su udžbenici iz područja biologije, a posjećivane su i mrežne stranice, uključujući stranice globalnih biotehnoloških tvrtki poput STEMCELL.

U ovaj pregledni diplomski rad uključeno je 60 literaturnih navoda.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. METODE UZGOJA 3D KULTURA

U tijelu se gotovo sve stanice nalaze u izvanstaničnom matriksu koji se sastoji od složene 3D vlaknaste mreže sa širokom raspodjelom vlakana i praznina koje pružaju složene biokemijske i fizičke signale. Konačni cilj dizajna 3D stanične kulture je oponašanje prirodnih značajki izvanstaničnog matriksa u dovoljnoj mjeri da stanice funkcioniraju u simuliranom okruženju kao što bi funkcionirale *in vivo* (Lee i sur., 2008). Molekule koje čine izvanstanični matriks uključuju proteine, glikoproteine, glikozaminoglikane, proteoglikane te čimbenike rasta, kao što su vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF), trombocitni čimbenik rasta (PDGF), čimbenik rasta hepatocita (HGF) (Breslin i O'Driscoll, 2013). Ti čimbenici rasta i proteini igraju ključnu ulogu u regulaciji stanične proliferacije, migracije, diferencijacije, adhezije i preživljavanja stanica (Jensen i Teng, 2020).

Pri ulasku u treću dimenziju, istraživači trebaju razmotriti dizajn skela/matrica (engl. *scaffold*) ili upotrebu bioreaktora za kontrolu izmjene hranjivih tvari i otpadnih proizvoda (Haycock, 2011). S obzirom na korištenu tehnologiju uzgoja kulture, odnosno primjenu trodimenzionalnih matrica, kulture dijelimo na 3D kulture bez matrice (engl. *scaffold-free*) i 3D kulture s matricom (engl. *scaffold-based*). U kulturama koje se temelje na matricama, stanične suspenzije se nasađuju na matrice koje služe kao skele na koje stanice prijanjaju i određuju trodimenzionalni oblik dobivene stanične kulture (Harb i sur., 2021). Najbitnija karakteristika matrice je njezina porozna struktura. Porozna struktura olakšava infiltraciju stanica, stvaranje sferoida, transport hranjivih tvari i metabolita, izmjenu plinova, dopremanje lijekova do stanica te otklanjanje otpadnih molekula. Postoje dvije vrste matrica – prirodne i sintetičke. Prirodne matrice uključuju izvanstanični matriks ili amnionsku tekućinu dobivenu iz tkiva, a sintetičke su izgrađene od biomaterijala, najčešće polimera koji mogu biti prirodni (kolagen, fibrin) i sintetski (polistiren, polikaprolakton) (Janić, 2019). Danas se koriste tehnike temeljene na matrici kao što je potpora na bazi hidrogela, potpora na bazi polimernih tvrdih materijala, hidrofilna staklena vlakna i organoidi, a svaka od njih ima svoje prednosti i primjene. Isto tako se koriste i tehnike bez matrice kao što su metoda viseće kapi i magnetska levitacija koje su jedinstvene po svojoj sposobnosti slobodnog rasta i kao rezultat toga pružaju posebne prednosti (Jensen i Teng, 2020).

Bitno je napomenuti da se ovo područje brzo razvija i da danas postoje mnoge metode i vrste tehnologija uzgoja 3D staničnih modela od kojih su u ovom diplomskom radu spomenute samo neke od njih.

## **4.2. METODE UZGOJA NA MATRICAMA**

### **4.2.1. Hidrogelovi**

Stanice se smještaju u matrice ili hidrogelove koji imaju sposobnost oponašanja prirodnog izvanstaničnog matriksa u tkivu. Ovi materijali pružaju podršku za rast stanica i omogućuju njihovu interakciju s okolnim matriksom (Langhans, 2018). Hidrogelovi su vrsta materijala koji se sastoje od mreže polimera koja je natopljena vodom. Ova mrežasta struktura polimera omogućava hidrogelovima da zadrže velike količine vode unutar svoje strukture. Sadrže križno povezane prirodne materijale kao što su agaroz, fibrin, kolagen i laminin (Janić, 2019). Dopuštaju topljivim tvarima kao što su citokini i čimbenici rasta da putuju kroz gel (Langhans, 2018). Hidrofilna priroda hidrogelova, kemijska stabilnost, biološka kompatibilnost i potencijal biorazgradljivosti učinili su ih prikladnim modelom za 3D studije staničnih kultura. Posebno su korišteni za postizanje dubljeg uvida u proces virusne infekcije istražujući kako virioni difundiraju u izvanstanični matriks prije nego što se pričvrste na stanice. Štoviše, hidrogelovi su bili idealni za pružanje 3D okruženja za proučavanje odgovora stanica na virusne infekcije, kao i za proučavanje djelovanja antivirusnih lijekova (Harb i sur., 2021). Upravo zbog vjernog oponašanja izvanstaničnog prostora često su primjenjivani i u tumorskim istraživanjima (Janić, 2019).

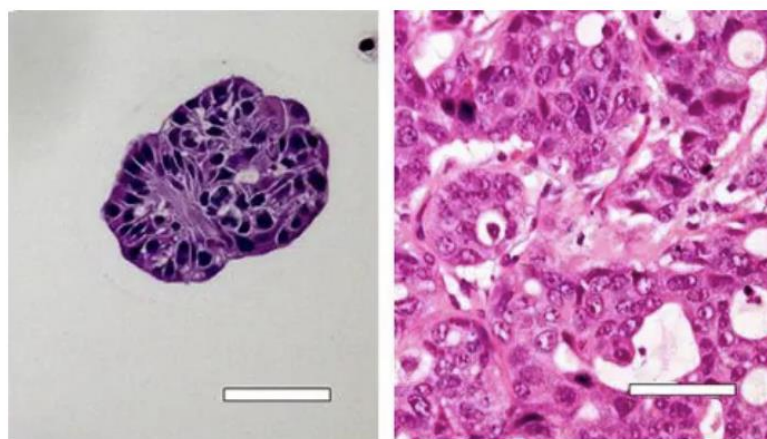
### **4.2.2. Organoidi**

Kako bi se prevladala ograničenja klasičnih 2D kultura, korištenje organoida plućnog tkiva u području istraživanja pluća veliko je otkriće. Organoidi su složeni višestanični trodimenzionalni *in vitro* modeli koji su dizajnirani da omogućе proučavanje molekularnih patoloških procesa ljudskih organa (Bosáková i sur., 2022). Predstavljaju funkcionalnu jedinicu koja se sastoji od hijerarhije matičnih stanica i diferenciranih stanica, a mogu se izvesti iz različitih tipova stanica

kao što su ljudske pluripotentne matične stanice ili tumorske stanice koje se ugrađuju u izvanstanični matriks (Kim i sur., 2019).

Korištenje 3D organoida kao alata za razumijevanje razvoja i funkcije pluća ima veliki potencijal za istraživanje genetskih poremećaja pluća kao što je cistična fibroza i u bolestima kao što su kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) i plućne infekcije, a naročito tumori (Bosáková i sur, 2022). Znanstvenici uzgajaju modele različitih tumora koristeći organoide uzgojene iz stanica tumora pacijenata. Stanice tumora izvedene su iz nekoliko uzoraka ljudskih primarnih tumora, uključujući rak debelog crijeva, gušterače, prostate, jetre, dojke i mokraćnog mjehura, a korištene su za uspostavljanje organoida koji uspješno rekapituliraju tumorska tkiva *in vivo*. Stoga su organoidi tumora izvedeni iz tkiva pacijenta predloženi kao alternativni *in vitro* modeli koji održavaju karakteristike tumora (Kim i sur., 2019). Modeliranjem tumora testira se terapija i liječenje od pacijenta do pacijenta. Također su pokazali kapacitet da bi jednog dana mogli pomoći u alternativnoj metodi transplantacije organa (Jensen i Teng, 2020). Sada je moguće razviti biobanku organoida pacijenata i koristiti te kulture za probir lijekova (Freshnley, 2021).

Organoidi predstavljaju budućnost modeliranja plućnih bolesti budući da omogućuju dugotrajni uzgoj ljudskog plućnog tkiva zadržavajući mnoge od njegovih fenotipskih i funkcionalnih karakteristika. Iskorištavanje potencijala koje organoidi mogu ponuditi poboljšat će terapije i dijagnostiku te time konačno poboljšati kvalitetu života ljudi pogođenih raznim plućnim bolestima (Bosáková i sur., 2022).



Slika 1: Morfološka i histološka usporedba organoida tumora pluća uzgojenog 3D metodom (lijevo) i nativnog tkiva *in vivo* (desno) (preuzeto iz [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).



### **4.3. METODE UZGOJA BEZ MATRICA**

3D kulture bez matrice oslanjaju se na stacionarne ili rotacijske sile koje agregiraju stanice u sferoide. Prema tome se dijele na statičke i dinamičke sustave. Jedna značajka koja razlikuje kulture bez matrica je prevladavanje interakcija stanica-stanica umjesto stanica-izvanstanični matriks čime je omogućena prirodna agregacija i razvoj sferoida sličan razvoju viđenom *in vivo* tijekom formiranja organa (Harb i sur., 2021).

#### **4.3.1. Metoda viseće kapljice**

Viseća kap (engl. *hanging drop*) jedna je od metoda dobivanja staničnih kultura bez matrica. Ova metoda ne zahtijeva specijaliziranu opremu i uključuje male količine stanične suspenzije (maksimalno 50  $\mu$ L). Najjednostavniji način dobivanja stanične kulture jest da se suspenzija stanica ispipetira u posebne jažice bez dna koje se okreću naopako tako da stanična suspenzija postane viseća kap koju drži površinska napetost. Stanice ostaju u izravnom kontaktu jedne s drugima i s izvanstaničnim matriksom (Białkowska i sur., 2020). Također se može koristiti i Petrijeva zdjelica na koju se ispeptira suspenzija čijim zatvaranjem opet nastaju viseće kapi. Petrijevu zdjelicu treba napuniti fosfatnim puferom kako ne bi došlo do dehidracije kapljica (Janić, 2019). Stanice se akumuliraju i tako stvaraju sferoide samoagregacijom djelovanjem gravitacije (Jensen i Teng, 2020). Prednosti ove metode su da je jednostavna, primjenjuje se u dugotrajnim istraživanjima i gotovo je 100 % reproducibilna (Janić, 2019).

#### **4.3.2. Magnetska levitacija**

Magnetska levitacija izvodi se ubrizgavanjem magnetskih nanočestica u stanice koje omogućuju agregaciju stanica u sferoid kada su izložene vanjskom magnetu (Jensen i Teng, 2020). Stanice se udružuju u 3D staničnu kulturu i proizvode izvanstanični matriks. U ovoj tehnici magnetska sila nadvladava gravitacijsku, a nakon djelovanja magnetskih sila sferoidi nastaju u roku od nekoliko sati tako da uslijed izlaganja stanica magnetu, stanice počnu levitirati i formirati sferoidnu strukturu (Białkowska i sur., 2020).

#### 4.4. 3D BIOPRINTING

Tehnologija 3D bioprintinga koristi računalne metode i 3D pisaae za stvaranje trodimenzionalnih struktura stanica. Stanice se ispisuju sloj po sloj kako bi se formirala željena tkivna struktura slična tkivu *in vivo* istovremenim i preciznim taloženjem stanica, bioloških materijala i potpornog matriksa u slojevima (Harb i sur., 2021).

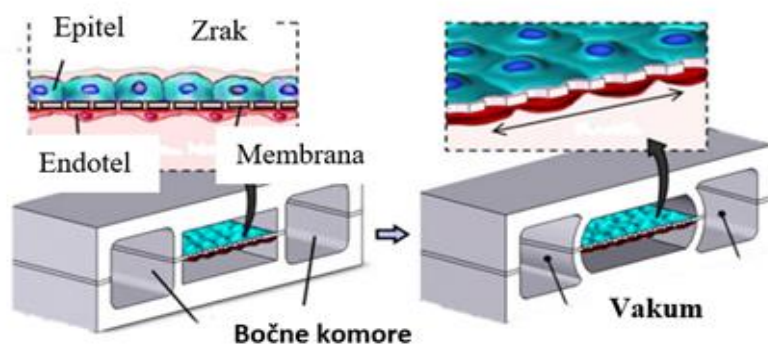
Nedavna studija istraživačkog tima iz Južne Koreje provedena je za izradu 3D modela alveolarne barijere tehnikom 3D bioprintinga koristeći četiri ljudske alveolarne stanične linije (Kang i sur., 2021). Model je uspješno simulirao strukturu i funkciju ljudskih alveola i korišten je za ispitivanje antivirusnog odgovora. Kada je model alveolarne barijere zaražen respiratornim patogenima kao što je virus influence A, tijekom infekcije i imunološki odgovor bili su slični stvarnom tkivu. Unatoč prednostima ovih tehnika 3D bioprintinga, njihova je uporaba ograničena zahtjevima složenih i skupih tehnologija. Mogućnost bioprintinga potpuno funkcionalnih organa još uvijek nije u potpunosti dostupna, ali ova tehnologija neprestano napreduje (Harb i sur., 2021).

#### 4.5. „PLUĆA NA ČIPU“

Tijekom proteklog desetljeća, razvoj i napredak u mikroprodukciji i biomaterijalima potaknuo je razvoj mikroinženjerskih modela tkiva i organa (engl. *organs-on-a-chip*) kao alternativu životinjskim i staničnim modelima. Ova najsuvremenija tehnologija korištena je za oponašanje ljudske fiziologije za istraživanje mnoštva staničnih i biomolekularnih procesa koji su uključeni u patološku osnovu bolesti (Nguyen i Ahsan, 2023). Također reproducira složene odgovore na razini organa na bakterije i upalne citokine unesene u alveolarni prostor. Ovaj pristup omogućio je mikroprodukciju modela krvnih žila, mišića, kostiju, dišnih puteva, jetre, mozga, crijeva i bubrega. Razvijen je višenamjenski mikrouređaj koji reproducira strukturalna i funkcionalna svojstva ljudskog alveolarno-kapilarnog sučelja, što je temeljna funkcionalna jedinica živih pluća. To je postignuto proizvodnjom mikrofluidnog sustava koji sadrži dva blisko postavljena mikrokanala odvojena tankom (10 μm) poroznom fleksibilnom membranom. Membrana je obložena izvanstaničnim matriksom (fibronektin ili kolagen), a ljudske alveolarne epitelne stanice i ljudske plućne mikrovaskularne endotelne stanice su uzgajane na suprotnim stranama membrane (Huh i sur., 2010). Tijekom normalnog udisaja, intrapleuralni tlak se smanjuje, uzrokujući širenje alveola što rezultira rastezanjem alveolarnog epitela i blisko postavljenog

endotela u susjednim kapilarama. Mikročipom se oponaša ovo rastezanje pod atmosferskim pritiskom, ugradnjom dviju većih bočnih mikrokomora. Kada vakuum djeluje na te komore, dolazi do elastične deformacije tanke stijenke koja odvaja mikrokanale koji sadrže stanice od bočnih komora; to uzrokuje rastezanje membrane i prijanjajućih slojeva tkiva. Kada se vakuum oslobodi, elastični trzaj membrane uzrokuje opuštanje same membrane i prijanjajućih stanica u njihovo prijašnje stanje. Ovaj dizajn replicira dinamičko mehaničko izobličenje alveolarno-kapilarnog sučelja uzrokovano pokretima disanja (Huh i sur., 2010).

„Pluća na čipu“ dobar su predklinički model jer zadržavaju heterogenost izvornog tumorskog tkiva što omogućuje personalizirano modeliranje bolesti, otvarajući novi smjer za personalizirano i precizno liječenje raka pluća. Pokazuju visok stupanj genotipske i fenotipske konzistentnosti s izvornim kliničkim uzorcima, koji uzimaju u obzir jedinstvene genetske i molekularne karakteristike tumora svakog pacijenta. Testira se osjetljivost pojedinačnih tumora na različite tretmane i za razvoj personaliziranih strategija liječenja za pacijente na temelju njihovih specifičnih karakteristika tumora (Zeng i sur., 2023). U kolovozu 2022. godine Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) je prvi put odobrila novi lijek (NCT104658472) za klinička ispitivanja što se temeljilo isključivo na pretkliničkim podacima o učinkovitosti dobivenima iz studija organoida na čipu (Zeng i sur., 2023).



Slika 2: Prikaz dizajna mikrouređaja "pluća na čipu". Uređaj za oponašanje pluća koristi mikrokanale za stvaranje alveolarno-kapilarne barijere na tankoj poroznoj fleksibilnoj membrani obloženoj izvanstaničnim matriksom, a epitelne i ednotelne stanice se nalaze sa suprotnih strana membrane. Uređaj rekreira fiziološke pokrete disanja primjenom vakuuma na bočne komore (preuzeto i prilagođeno prema Huh i sur., (2010) uz dopuštenje izdavača).

Sindrom akutnog respiratornog distresa (ARDS) je teško stanje pluća s visokom smrtnošću i različitim uzrocima, uključujući infekciju pluća. Trenutno nije dostupno specifično liječenje i potrebno je više istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja patofiziologije ARDS-a. Model „pluća na čipu“ je korišten za istraživanje migracije i ekstravazacije imunoloških stanica tijekom upale pluća. Trokanalni perfuzibilni sustav upale na čipu oponaša plućnu endotelnu barijeru, izvanstanični matriks i upalnu epitelnu barijeru pluća. Uspostavljen je kemotaktički gradijent preko hidrogela izvanstaničnog matriksa što dovodi do migracije imunoloških stanica kroz endotelnu barijeru. Istraživanjem je otkriveno da ekstravazacija imunoloških stanica ovisi o prisutnosti endotelne barijere, o gustoći i krutosti izvanstaničnog matriksa te o profilu protoka (van Os i sur., 2023).

Oksidacijski stres i upala izazvana pušenjem cigareta povezani su s patološkim procesom raznih kroničnih respiratornih bolesti, uključujući astmu, emfizem, KOPB i rak. Za jedno istraživanje izrađena su „pluća na čipu“ koja su izložena dimu cigareta te je ispitana pojava oksidacijskog stresa i upale. Rezultati su pokazali da stanično oštećenje, oksidacijski stres i upalni odgovor izazvan dimom cigarete u čipu ovise o koncentraciji dima i vremenu nakon izlaganja dimu (Xue i sur., 2023).

#### **4.6. 3D MODELI U ISTRAŽIVANJU PLUĆNIH BOLESTI**

Tijekom posljednjih desetljeća tkivno inženjerstvo postiglo je ogroman napredak. Uspostavljeno je nekoliko *in vitro* modela za proučavanje respiratornih bolesti čiji je cilj poboljšati naše razumijevanje (pato)fizioloških procesa. Trenutno su dostupni *in vitro* modeli pluća svih važnih segmenata dišnog sustava, počevši od nosne šupljine i dušnika do proksimalnih i distalnih dišnih puteva (Zscheppang i sur., 2018).

Za modeliranje ljudskog dišnog sustava mogu se koristiti različite vrste stanica, uključujući besmrtno respiratorne stanične linije i primarne stanice životinjskih ili ljudskih donora. Iako je korištenje besmrtnih staničnih linija i primarnih stanica iz životinja uobičajeno, rezultati dobiveni pomoću ovih modela nisu izravno primjenjivi na ljude ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)). Modeli stanične kulture epitela ljudskih pluća temelje se na primarnim stanicama, uključujući ljudske bronhijalne epitelne stanice ili pluripotentne matične stanice. Kako bi se potaknula

diferencijacija stanica, stanice se obično uzgajaju na biokompatibilnim skelama ili matricama kako bi oponašale prirodni okoliš. Najčešće korištene stanične linije epitela pluća su Calu-3, H441, 16HBE14o- i A549 (Zscheppang i sur., 2018). Komercijalno dostupni 3D modeli dobiveni od zdravih i oboljelih od respiratornih bolesti imaju veću fiziološku relevantnost. Prednosti ovih komercijalnih modela u odnosu na nekomercijalne primarne stanice uključuju spremnu upotrebu odmah, manju varijabilnost od serije do serije i duže vrijeme skladištenja. To omogućuje njihovu upotrebu za dugotrajne studije (Silva i sur., 2023).

Tablica 1: Prikaz 3D modela korištenih u istraživanju plućnih bolesti te njihove glavne prednosti i nedostaci (prilagođeno iz Zscheppang i sur., 2018).

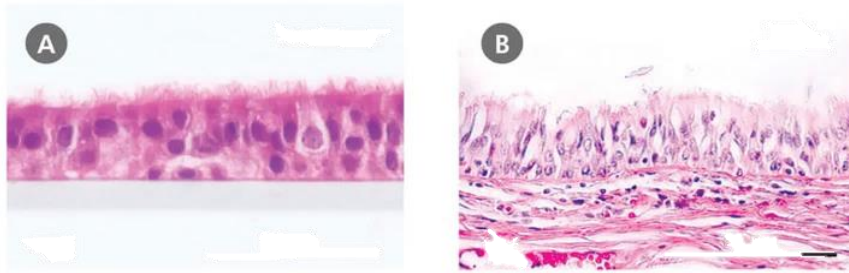
<b>Granica medij-zrak</b>	Dugotrajna kultivacija (tjedni do mjeseci) Moguća perfuzija Veliki izbor funkcionalnih studija Simulacija disajnih pokreta pluća Visoka ponovljivost podataka Niske varijabilnosti od serije do serije Može se oponašati nekoliko bolesti	Nedostatak složenosti Nedostatak mogućnosti izmjene
<b>Sferoidi</b>	Jednostavna metoda Omogućuje ko-kulturu s različitim tipovima stanica	Kratkotrajna kultivacija (sati do dani)
<b>Eksplantanti plućnog tkiva</b>	Model staničnog i molekularnog međudjelovanja Moguće snimanje živih stanica Genetske modifikacije postaju moguće	Kratkotrajna kultivacija (do 96 h) Nema sistemske perfuzije Nema ventilacije Genetske modifikacije i dalje su teške
<b>Izrezani reznjevi pluća</b>	Dugotrajna kultivacija (do 1 tjedna) Zadržava staničnu i strukturnu organizaciju pluća	Potrebno je ispiranje agarozom niske točke taljenja
<b>Bronhijalni prstenovi</b>	Izravno ispitivanje bronhijalnih fizioloških odgovora, npr. kontrakcija	Kratkotrajna kultivacija (sati do dani)
<b>Ex vivo perfuzirana i ventilirana ljudska pluća</b>	Ispitivanje stvaranja edema pluća, kapaciteta oksigenacije, vaskularne reaktivnosti, bakterijske infekcije i terapije matičnim stanicama	Ograničena dostupnost Do sada se uzgajalo samo na nekoliko sati
<b>Modeli temeljeni na matricama</b>	Održavaju karakteristike odgovarajućih patologija bolesti Kultivacija do 1 mjeseca	Ograničen pristup hranjivim tvarima i kisiku u unutarnjim dijelovima matrice

#### 4.6.1. Granica medij-zrak

Važan korak za poboljšanje 3D modela je kultura plućnih epitelnih stanica uzgojenih na granici medij-zrak (engl. *air-liquid interface*, *ALI*) zbog povećane izloženost kisiku i zraku. Bronhijalne epitelne stanice uzgojene u uvjetima *ALI* razvijaju trodimenzionalni, višestanični epitel koji se sastoji od bazalnih stanica, stanica s trepetljikastom površinom i vrčastih stanica (Zscheppang i sur., 2018).

Definirajuća značajka *ALI* kulture je da je bazalna površina stanica u kontaktu s tekućim medijem kulture, dok je apikalna površina izložena zraku čime se oponašaju uvjeti koji se nalaze u ljudskim dišnim putevima ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)). Kulture se dobivaju nasađivanjem stanica na polupropusnu podlogu i uklanjanjem medija s apikalne strane nakon adhezije stanica. Ovo eksperimentalno stanje omogućava više kisika i pomiče stanično disanje u aerobnije stanje. Posljedično se ubrzava oksidacijski stanični metabolizam što potiče staničnu diferencijaciju (Silva i sur. 2023). *ALI* modeli stoga omogućuju dobivanje relevantnih podataka o respiratornom traktu budući da se mogu konstruirati iz stanica koje potječu od ljudi i stoga su sposobni oponašati uvjete i stanja bliske onima *in vivo* (Baldassi i sur., 2021). Potiče se stvaranje *gap-junctions* i omogućuje bolje izlaganje stanica lijekovima pa su koristan model za proučavanje propusnosti i transporta lijeka te istraživanje molekularnih signalnih puteva (Silva i sur., 2023). Nadalje, *ALI* kulture primarnih stanica donora s respiratornom bolešću (npr. astma, cistična fibroza, KOPB) rekapituliraju *in vivo* karakteristike bolesti, tvoreći robusne *in vitro* modele za proučavanje ovih bolesti ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)).

Nekoliko tvrtki se specijaliziralo za izradu *ALI* modela koji oponašaju morfologiju zdravog i bolesnog ljudskog tkiva. Dva od ovih modela, dostupni pod markama MucilAir™ (Epithelix) i EpiAirway™ (MatTek Corporation), napravljeni su od primarnih ljudskih epitelnih nazalnih i bronhijalnih stanica. S dva druga modela koji izražavaju drugačiji fenotip, EpiAlveolar™ i SmallAir™, znanstvenici dodatno mogu analizirati utjecaj različitih lijekova na donji respiratorni trakt. Dvije vodeće tvrtke u ovom području, MatTek Corporation i Epithelix, nedavno su razvile ko-kulture *ALI* epitelnih stanica i fibroblasta (EpiAirway™ FT, MucilAir™ HF) za napredniju analizu interakcije stanica i bolje oponašanje *in vivo* uvjeta. Ovi komercijalni modeli otvaraju različite mogućnosti za daljnje modifikacije s drugim tipovima stanica, bakterijama i virusima, ovisno o primjeni (Baldassi i sur., 2021).

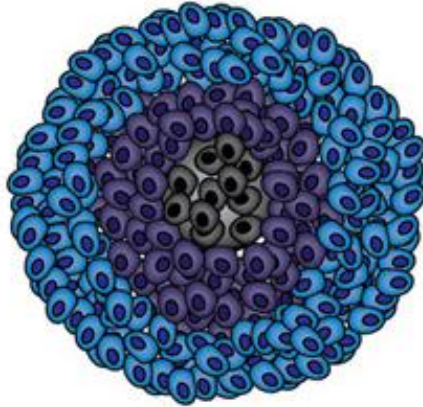


Slika 3: Primarne humane bronhijalne epitelne stanice uzgojene na granici medij-zrak (A) reprezentativne su bronhijalnom epitelu *in vivo* (B) (preuzeto i prilagođeno prema [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com))

#### 4.6.2. Stanični sferoidi

Stanični sferoidi jedni su od najčešće korištenih 3D modela u istraživanju plućnih bolesti zato što su jednostavni, a njihovo se stvaranje temelji na agregiranju stanica. Stanice se aglomeriraju u 3D sferoidne strukture zbog membranskih proteina (integrina) i proteina izvanstaničnog matriksa koji simuliraju organizaciju stanica u tkivu. Stanice unutar sferoida u bliskom su kontaktu čime se omogućuje fizički kontakt i stanična signalizacija kakva je prisutna u stanicama i tumorima *in vivo* (Białkowska i sur., 2020). Stanice su u različitim fazama rasta smještene u različitim slojevima. Vijabilne stanice koje su većinom u S fazi staničnog ciklusa smještene su u vanjskom sloju sferoida i izložene lako dostupnom izvoru hranjivih komponenti iz staničnog medija. Srž sferoida je hipoksična zona s nekrotičnim središtem, odnosno stanicama koje se pretežito nalaze u nekrozi ili apoptozi (Janić, 2019). Postoji nekoliko metoda za uzgoj stanica u sferoidima poput metode temeljene na matricama ili hidrogelovima ili metode viseće kapi koje ne koriste matrice. Sferoidni model služi kao most između konvencionalnih dvodimenzionalnih sustava kulture i tumora *in vivo*. Vjeruje se da sferoidi oponašaju ponašanje tumora učinkovitije od običnih dvodimenzionalnih (2D) staničnih kultura jer, poput tumora, sadrže i površinski izložene i duboko ukopane stanice, proliferirajuće i neproliferirajuće stanice te hipoksični centar s dobro oksigeniranim vanjskim slojem stanica ([www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com)). Također imaju svoju primjenu i u ispitivanju lijekova i nanočestica te u modeliranju bolesti (Białkowska i sur., 2020).





Slika 4: Konfiguracija sferoidne kulture tumora. Plavom bojom su prikazane žive stanice tumora, ljubičastom bojom su prikazane stanice pod oksidacijskim stresom, a sivom bojom su prikazane nekrotične stanice (preuzeto i prilagođeno prema Kamatar i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača).

#### 4.6.3. Ograničenja 3D modela u istraživanjima

Glavni nedostaci 3D modela su njihova slaba standardizacija koja je zahtjevna i otežava međulaboratorijsku ponovljivost. Još jedna velika prepreka je nedostatak složenosti modela jer se živo tkivo *in vivo* još uvijek ne može u potpunosti oponašati *ex vivo* – vaskularizacija, imunološki odgovori i regeneracija tkiva još nisu mogući na svim modelima. Osim standardizacije, potrebno je osmisliti način kako produljiti vrijeme kultivacije modela poput eksplantiranih kultura plućnog tkiva i režnjeva plućnog tkiva kako bi se omogućilo istraživanje dugotrajnijih procesa u plućima. U tu se svrhu radi na implementaciji kultura eksplantata pluća u mikrofluidne modele čime bi se mogla poboljšati prehrana tkiva i trajanje kulture (Zscheppang i sur., 2018). Jedan od uzroka visoke cijene lijekova i glavnih prepreka brzom prepoznavanju novih toksina iz okoliša nedostatak je sustava eksperimentalnih modela koji mogu zamijeniti skupe i dugotrajne studije na životinjama. Iako je učinjen značajan napredak u razvoju modela staničnih kultura kao surogata tkiva i organa za ove vrste istraživanja, kultivirane stanice obično ne uspijevaju održati diferencijaciju i ekspresiju funkcija specifičnih za tkivo. Poboljšana organizacija tkiva može se postići uzgojem stanica u gelovima trodimenzionalnog izvanstaničnog matriksa; međutim, te metode još uvijek ne uspijevaju rekonstituirati strukturne i mehaničke značajke cijelih živih organa koje su ključne za njihovu funkciju (Huh D, 2010).

## 4.7. PRIMJENA U ISTRAŽIVANJU PLUĆNIH BOLESTI

Kronična respiratorna upalna stanja uočena u bolesnika s astmom, cističnom fibrozom i KOPB-om glavni su uzroci smrti i morbiditeta diljem svijeta. Osim toga, rak pluća i respiratorne infekcije, uključujući globalnu pandemiju bolesti COVID-19 (engl. *coronavirus disease 2019*) od 2020. godine, česti su uzroci smrtnosti, stoga se hitno traže učinkovitije strategije liječenja, posebice za bolesti koje uzrokuju ireverzibilnu destrukciju tkiva i gubitak funkcije pluća (Baldassi i sur., 2021). Velika društvena i medicinska potreba za boljim razumijevanjem ljudskih plućnih bolesti potkrepljuje nužnost razvoja modela za proučavanje akutnih i kroničnih plućnih bolesti. U tu svrhu, nedavno razvijene tehnike sada omogućuju inovativnu i smislenu primjenu 3D modela u istraživanju plućnih bolesti (Zscheppang i sur., 2018).

### 4.7.1. Tumor pluća

Tumor pluća bolest je u kojoj se maligne stanice nalaze u tkivima pluća i jedan je od najčešćih oblika raka u svijetu pa tako i u Hrvatskoj ([www.onkologija.hr](http://www.onkologija.hr)). Rak pluća je jedan od najagresivnijih malignih tumora i uključuje dvije glavne vrste: rak pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer, NSCLC*) i rak pluća malih stanica (engl. *small cell lung cancer, SCLC*). Rak pluća nemalih stanica NSCLC čini 85 % slučajeva raka pluća, uključujući tri glavna podtipa: adenokarcinom, karcinom skvamoznih stanica i karcinom velikih stanica (Lu i sur., 2019). Gotovo 90 % svih bolesnika s karcinomom pluća su pušači ili bivši pušači, ali i nepušači također mogu razviti tumor. Tumor pluća češći je kod muškaraca nego kod žena, a najčešće se dijagnosticira u osoba u dobi od 65. do 74. godine ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Prema statistici u Hrvatskoj, najčešći je karcinom u muškaraca te drugi najčešći karcinom u žena ([www.onkologija.hr](http://www.onkologija.hr)). Godišnje se otkrije više od 3000 novih slučajeva raka pluća, velikom većinom u pušača. Nažalost, gotovo isti broj bolesnika umire svake godine od ove smrtonosne bolesti (<https://zdravlje.gov.hr>). Petogodišnje preživljenje od karcinoma pluća u Sjedinjenim Američkim Državama je oko 16 %, dok su podaci za Hrvatsku značajno lošiji te je petogodišnje preživljenje oko 10 % (<https://zdravlje.gov.hr>).

Budući da konvencionalne 2D stanične kulture nisu sposobne oponašati složenu strukturu i mikrookruženje tumora pluća *in vivo*, 3D stanične kulture i ko-kulture uvelike doprinose istraživanju patofiziologije tumorskih stanica, a također i otkrivanju lijekova protiv tumora (Baldassi sur., 2021). Tumorske stanice uzgojene pomoću metoda 3D stanične kulture zauzele su središte pozornosti u istraživanju biologije tumorskih stanica (Jensen i Teng, 2020). Istraživači su proučavali nekoliko modela ranog raka pluća: uzorke tumora pacijenata s ranim rakom pluća, genetski modificirane modele miševa i organoide pluća. Izveli su organoide ili iz matičnih stanica mišjih pluća ili iz plućnih stanica stvorenih od ljudskih induciranih pluripotentnih matičnih stanica (hsci.harvard.edu). 3D tumorski sferoidi i organoidi među najkorištenijim su metodama kulture stanica u ovom području i imaju glavnu primjenu u istraživanju rasta, proliferacije i invazije tumora te probira lijekova (Movia i Prina-Mello, 2023). Organoidi mogu oponašati visoku staničnu organizaciju, tumorsko mikrookruženje i stanične interakcije *in vivo* tumorskog tkiva. Kao takvi, organoidi se koriste u različitim kontekstima od karcinogeneze do personalizirane medicine i razvoja lijekova (Bosáková i sur., 2022).

Međutim, 3D sferoidi ne oponašaju izravan kontakt epitela pluća s plinovitom fazom, što je ključna značajka strukture i funkcije respiratornog trakta. Posljedično, te kulture nisu prikladni modeli za ispitivanje učinkovitosti lijekova u obliku aerosola. Za ispitivanje učinkovitosti inhalacijskih lijekova protiv raka, važno je oponašati izravan kontakt plućnog epitela s plinovitom fazom. *ALI* kulture su jedini dostupan *in vitro* model koji može reproducirati ovu značajku (Movia i Prina-Mello, 2023). *ALI* sustavi se koriste za proučavanje točnih mehanizama malignih transformacija različitih tipova stanica zbog njihove sličnosti s fiziologijom ljudskih pluća. Služe ne samo za karakterizaciju rasta tumora i mikrookruženja različitih tipova stanica, već i za stjecanje dubljeg znanja o mehanizmima otpornosti kod raka pluća. Takvi modeli snažno poboljšavaju učinkovitost probira kemoterapeutika i kombinacija lijekova te služe kao prvi korak prije provođenja skupih pretkliničkih ili kliničkih studija *in vivo* (Baldassi i sur, 2021).

OncoCilAir™ (Epithelix Sàrl, Švicarska) je komercijalni 3D model ljudskog raka pluća koji kombinira funkcionalno rekonstituirani ljudski epitel dišnih puteva, ljudske plućne fibroblaste i stanice adenokarcinoma pluća koji se može koristiti za testiranje učinkovitosti lijekova, učinaka toksičnosti i recidiva tumora. Glavna prednost ovih modela je njihova sposobnost dugoročnog uzgoja. OncoCilAir™ i EpiAirway® imaju vijek trajanja do 3 mjeseca, dok se MucilAir™ može uzgajati do 12 mjeseci što omogućuje dugoročne i ponovljene studije. Glavni

nedostaci komercijalnih modela su nedostatak složenosti i mogućnost prilagodbe za određene primjene (Zscheppang i sur., 2018). Uspostavljeni su složeniji modeli raka pluća i tumora koji služe kao alati za prepoznavanje novih meta lijekova. Trodimenzionalni decelularizirani tkivni matriks izveden iz pluća glodavaca recelulariziran je staničnom linijom ljudskog raka pluća kako bi se dobio model tumora koji se može perfuzirati. Alternativno, opisan je 3D model temeljen na kolagenskom gelu koji sadrži stanice adenokarcinom ljudskih pluća, stanice fibroblasta ljudskih pluća i makrofage (Zscheppang i sur., 2018).

U nastojanju da se shvati kako primarni rak pluća napreduje do metastatskog raka pluća, provedena je studija u kojoj je korišten 3D uzgoj stanica za promatranje migracije stanica raka pomoću Matrigel testova invazije (Xiong i sur., 2019). 3D testovi invazije izvedeni su na HN12 (stanice razvijene su iz tumorskih stanica čovjeka s metastatskim planocelularnim karcinomom glave i vrata) stanicama koje su nasadene u SeedEZ 3D prsten. Stanice su obojene Texas-crvenim faloidinom nakon 10 dana rasta i promatrane pod fluorescentnim mikroskopom. Ono što je studija otkrila upotrebom ovih metoda je da je NCKAP1 (engl. *Nck-associated protein 1*) visoko povezan s primarnim rakom pluća nemalih stanica i metastazama u odnosu na normalna plućna tkiva. Prekomjerna ekspresija NCKAP1 uzrokuje aktivaciju MMP-9 (engl. *matrix metalloproteinase 9*) čime se izazivaju invazija i metastaze. Korištenje Matrigela i 3D testova invazije bili su ključni za razumijevanje veze između NCKAP1 i MMP-9 u shvaćanju kako primarni rak pluća napreduje do metastatskog raka pluća (Jensen i Teng, 2020).

Istraživači koriste KRAS (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*) mutirane tumore; KRAS mutacija izaziva rak u alveolarnim progenitornim stanicama plućnih organoida. Zatim je upotrebljeno sekvenciranje ribonukleinske kiseline (RNA) kako bi se vidjelo koji su geni eksprimirani i kada. S vremenom se oučila smanjena ekspresija gena koji obilježavaju zrele plućne alveolarne stanice, a povećana je ekspresija gena uključenih u rani razvoj pluća - biljega progresije raka (hsci.harvard.edu).

Mnoge studije tumora pluća koriste 3D modele za terapijski probir i ispitavanje učinkovitosti i isporuke lijeka. Hai i sur. (2020) razvili su genetski modificirane mišje organoide pluća za oponašanje karcinoma skvamoznih stanica ljudskih pluća i upotrijebili ovaj model da pokažu da liječenje inhibitorom WEE1 kinaze i blokadom proteina PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*) pojačava antitumorsku aktivnost T-stanica. WEE1 kinaza je serin-treonin kinaza koja regulira prijelaz kontrolnih točaka iz G2 faze u fazu mitoze. Sprečava ulazak stanice u mitozu kako bi se omogućio popravak deoksiribonukleinske kiseline (DNA) tijekom oštećenja (Kong i Mehanna, 2021). PD-1 je protein koji se nalazi u T-stanicama i pomaže u održavanju i kontroli

imunološkog odgovora tijela. Neki antitumorski lijekovi, koji se nazivaju inhibitori imunoloških kontrolnih točaka koriste se za blokiranje PD-1. Kada se ovaj protein blokira, otpuštaju se "kočnice" imunološkog sustava i povećava se sposobnost T stanica da ubiju stanice tumora (www.cancer.gov). Koristeći ovaj mišji model i trodimenzionalni tumoroidni sustav kulture provjerila se učinkovitost ovih antitumorskih lijekova. Pokazano je da inhibicija WEE1 izaziva oštećenje DNA koje pokreće endogeni interferon tipa I i sustav prezentacije i prepoznavanja antigena u primarnim tumorskim stanicama. Ovi događaji potiču čišćenje tumorskih stanica citotoksičnim T stanicama i smanjuju nakupljanje neutrofila koji infiltriraju tumor. Korisna imunološka svojstva inhibicije WEE1 kinaze dodatno su poboljšana dodatkom anti-PD-1 terapije (Hai i sur., 2020).

#### **4.7.2. Kronična opstruktivna plućna bolest**

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je plućna bolest koja zahvaća male dišne puteve, plućni parenhim kao i veće dišne puteve, a karakterizirana je progresivnom opstrukcijom i smanjenim protokom zraka kroz dišne puteve koja u konačnici dovodi do zatajenja pluća (Baldassi i sur., 2021). KOPB se zajedno s astmom smatra jednom od kroničnih bolesti dišnog sustava. Na temelju izvješća Svjetske zdravstvene organizacije, pogađa više od 250 milijuna ljudi diljem svijeta, s više od 90 % smrtnosti u zemljama s niskim i srednjim dohotkom (Baldassi i sur., 2021). Zbog ove bolesti svake godine umre više od 3 milijuna ljudi diljem svijeta (Rabe i Watz, 2017).

Akutne egzacerbacije KOPB-a su epizode pogoršanja simptoma poput dispneje, gnojnosti sputuma, ali mogu uključivati i slabije simptome poput začepljenja nosa, iscjetka, piskanja, grlobolje, kašlja, vrućice, umora, poremećaja sna ili ograničenje tjelesne aktivnosti. Važni uzroci egzacerbacija uključuju bakterije, viruse i onečišćenja zraka (Ritchie i Wedzicha, 2020). KOPB je izravno povezana s izloženošću pluća toksičnim zagađivačima kao što su duhanski dim ili ispušni plinovi dizela (Baldassi i sur., 2021). Unatoč napretku u liječenju simptoma i prevenciji akutnih egzacerbacija, postignut je mali napredak u ublažavanju napredovanja bolesti ili utjecaju na smrtnost (Rabe i Watz, 2017). Abnormalni upalni odgovor tipičan za KOPB povezan je s povećanom prisutnošću upalnih stanica u dišnim putevima, pri čemu neutrofili, makrofazi i CD8<sup>+</sup> T-stanice igraju najveću ulogu. Ove stanice luče citokine i kemokine, uključujući čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ , engl. *tumor necrosis factor*

*alpha.*), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i interleukin-8 (IL-8) koji posreduju u upali. U ovom neuravnoteženom stanju, epitelne stanice nisu samo meta upalnih medijatora, već i same izlučuju citokine i kemokine koji pogoršavaju upalno stanje (Baldassi i sur., 2021). Stoga je potrebno bolje razumijevanje složenih mehanizama bolesti koji rezultiraju KOPB-om, a programi prestanka pušenja, povećanje tjelesne aktivnosti te rano otkrivanje i liječenje daljnje su ključne komponente za smanjenje tereta bolesti (Rabe i Watz, 2017).

Nedostatak fiziološke važnosti tradicionalnih 2D modela stanične kulture, kao i ograničena predvidljivost testova koji se izvode na životinjskim modelima, snažno ograničavaju razumijevanje patofiziologije i otkrivanje lijekova za ovu bolest. Uzimajući u obzir središnju ulogu epitelnih stanica u KOPB-u, *ALI* modeli mogu pružiti dublje razumijevanje mehanizma bolesti kao i oponašanje *in vivo* plućnog okruženja (Baldassi sur., 2021). Ponavljajuće infekcije smatraju se važnim čimbenikom koji ubrzava bolest kod KOPB-a, pa istraživači uspoređuju učinak infekcija na 3D *ALI* kulturama dobivenih od zdravih ljudi i pacijenata s KOPB-om. Promjena funkcije epitela pluća na modelima reznja tkiva ili *ALI* modela toksičnim zagađivačima kao što su dim cigareta ili ispušni plinovi također su sve šire područje istraživanja u polju KOPB-a. Studije sežu od promatranja akutnih učinaka do istraživanja dediferencijacije epitela pacijenata (Zscheppang i sur., 2018). Nekoliko je studija pokazalo da se nakon uzgoja i diferencijacije stanica *ALI* metodom, stanice mogu izložiti dimu cigareta kako bi se dobio *in vitro* sustav koji oponaša većinu učinaka cigareta opaženih i *in vivo*. Otkriveno je da izloženost zdravih ljudskih bronhijalnih epitelnih stanica cigaretnom dimu mijenja diferencijaciju i funkcionalnost stanica. Osim što je pokazano da dim narušava integritet epitelne barijere, utječe i na staničnu diferencijaciju što je rezultiralo povećanim brojem stanica koje izlučuju sluz. Ove promjene uzrokovale su okruženje pluća bogato sa sluzi (Baldassi i sur., 2021). Učinak dima cigarete na cjelovitost barijere također se odražava u povećanoj osjetljivosti na mikrobnе infekcije. Ko-kultura epitelnih stanica uzgojenih na *ALI* i bakterija razvijena je zajedno s izlaganjem dimu cigareta. Prilikom uzgoja primarnih epitelnih stanica pacijenata oboljelih od KOPB-a i onih zdravih, proučavale su se različite reakcije na *Haemophilus influenzae* nakon izlaganja dimu cigareta. Primjećeno je da je antibakterijsko djelovanje smanjeno u stanicama bolesnika s KOPB-om i potisnuto nakon izlaganja dimu cigareta u odnosu na zdrave stanice (Amatngalim i sur., 2017).

U istraživanju KOPB-a, nekoliko je studija koristilo modele za proučavanje staničnih mreža uključenih u bolest. Jedna od studija je koristila ko-kulture formirane od primarnih epitelnih stanica bolesnika s KOPB-om i B-stanica za testiranje utjecaja bronhijalnog epitela na

humoralni odgovor u plućima. Unatoč njihovoj važnosti za obranu sluznice, proizvodnja imunoglobulina A (IgA) i funkcija plućnih B-stanica su nepoznanica u patologiji KOPB-a. Promatran je učinak interleukina-6 (IL-6) kojeg izlučuju epitelne stanice na izlučivanje IgA iz B-stanica koje je povećano u pacijenata s KOPB-om. U plućnom tkivu KOPB-a povećana je sinteza IgA1, što je dovelo do njegovog nakupljanja u subepitelnim područjima. *In vitro*, bronhijalni epitel KOPB-a utisnuo je normalne ljudske B-stanice za povećanu proizvodnju IgA (uglavnom IgA1) i sazrijevanje u CD38+ plazma stanice (Ladjemi i sur., 2015).

Osim što se 3D modeli koriste za istraživanje pokretačkih mehanizama bolesti, primjenjuju se i za *in vitro* probir potencijalnih lijekova. Do sada je većina studija povezanih s proučavanjem lijekova provedena korištenjem *ALI* kultura koje su uključivale samo jednu staničnu liniju, uglavnom epitelne stanice. Jedan od primjera jest korištenje Calu-3 stanične linije (stanice raka pluća nemalih stanica) za ispitivanje učinka simvastatina, lijeka koji posreduje u smanjenom lučenju sluzi epitelnih stanica pacijenata s KOPB-om. Proučen je transport simvastatina kroz epitelne stanice Calu-3 i njegovo farmakološko djelovanje na smanjenje proizvodnje sluzi. Simvastatin je uspješno transportiran i zadržan unutar Calu-3 stanica. Dokazano je da je primjena simvastatina tijekom 14 dana uzrokovala značajnu inhibiciju proizvodnje sluzi čime je zaključeno da terapija simvastatinom ima obećavajući pristup liječenju KOPB-a (Marin i sur., 2013).

#### **4.7.3. Astma**

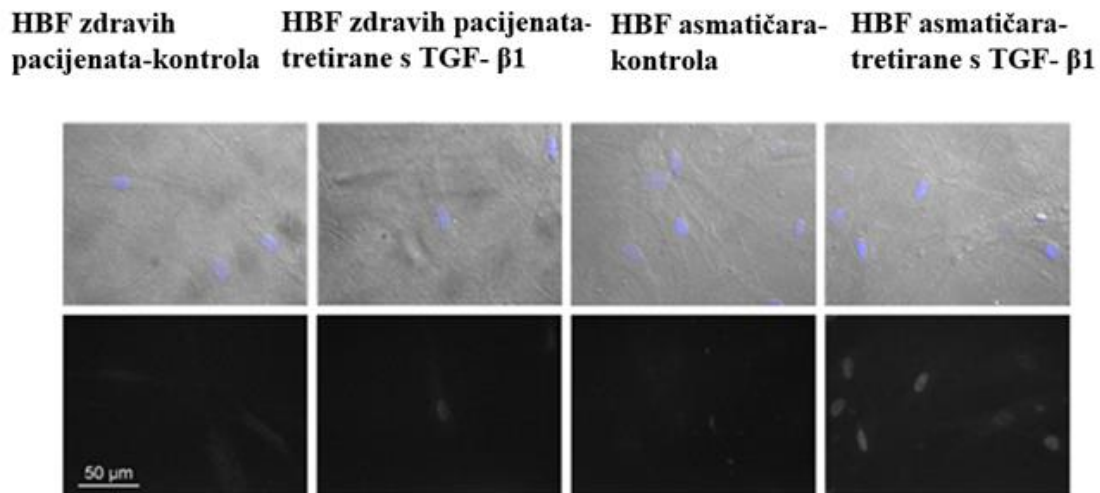
Astma je kronična plućna bolest čija je etiopatologija još uvijek nejasna. I virusi i bakterije su mogući čimbenici razvoja bolesti i odgovorni su za njezino pogoršanje (Bar i sur., 2023). Karakterizirana je različitim stupnjevima opstrukcije protoka zraka, rekurentnim zviždanjem, nedostatkom daha, stezanjem u prsima, kroničnim kašljem i stvaranjem sputuma (Yamasaki, 2023). Mehanizmi koji stoje iza upalnog statusa oslanjaju se na neodgovarajuće imunološke odgovore na uobičajene inhalacijske alergene koji pokreću izlučivanje citokina. Osim Th2 stanica, uključene su i druge imunološke stanice kao što su eozinofili, mastociti i dendritične stanice, što definira astmu kao imunološki poremećaj (Baldassi i sur., 2021). Imunologija astme sastoji se od različitih molekularnih puteva koji uključuju citokine, kemokine i transkripcijske čimbenike koji upravljaju signalizacijom između urođene i adaptivne imunosti (Aydin i sur., 2021).

Epitelne stanice uzgojene na *ALI* kulturama mogu se koristiti kao moćno sredstvo za oponašanje astmatičnog epitela *in vitro* uz veliku sličnost *in vivo* situaciji. Najjednostavniji način za reprodukciju polariziranog epitela na *ALI* modelu za istraživanje astme je korištenje uobičajenih linija epitelnih stanica respiratornog trakta kao što su 16HBE14o-, BEAS-2B i Calu-3. Primarne stanice astmatičara pokazuju značajne razlike od onih dobivenih od zdravih osoba zbog povećanog lučenja upalnih citokina i proizvodnje sluzi (Baldassi i sur., 2021).

SMAD (engl. *suppressor of Mothers against decapentaplegic*) proteini su unutarstanične molekule koje posreduju u kanonskoj signalnoj kaskadi superobitelji transformirajućeg čimbenika rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) koja uključuje i TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 kao ligand veže se za receptore na površini stanice i aktivira SMAD proteine u citoplazmi, tada se aktivirani SMAD proteini translociraju u jezgru kako bi aktivirali ili potisnuli specifičnu transkripciju ciljnog gena (Song i sur., 2009). Utvrđeno je da je prijelaz fibroblasta u miofibroblaste fenomen u fibrozi stijenke bronha ključan za razvoj astme. Prijelaz fibroblasta u miofibroblaste pojačan je kod astmatičara u usporedbi s fibroblastima pacijenata koji nemaju astmu što je dokazano jednom studijom koristeći 3D *in vitro* kulture. Već nekoliko godina koriste se *in vitro* modeli ljudskih bronhijalnih fibroblasta (HBF, engl. *human bronchial fibroblasts*) dobivenih od pacijenata s astmom i zdravih pacijenata. Cilj ove studije bio je procijeniti učinak staničnog mikrookruženja na prijelaz stanica astmatičara i zdravih pacijenata iz fibroblasta u miofibroblaste izazvan TGF- $\beta$ 1 s posebnim naglaskom na TGF- $\beta$ 1 signalizaciju ovisnu o SMAD-u. Morfologija fibroblasta koji rastu u 3D uvjetima u oštroj je suprotnosti s onom poznatom iz *in vitro* 2D kulture na krutim ravnim površinama i varira ovisno o karakteristikama matrice, kao što su njezina gustoća i krutost. 3D kulture HBF-a pripremljene su na kolagenskim matricama uz optimalnu koncentraciju kolagena za rast HBF stanica. Mikroskopskim promatranjem uočeno je da su HBF astmatičara zadebljali kolagena vlakna, što može ukazivati na jak prijelaz fibroblasta u miofibroblaste nakon tretmana s TGF- $\beta$ 1. Kako bi se potvrdio jači prijelaz u miofibroblaste kod astmatičara, analizirani su ključni geni povezani s tom pojavom. Usporedba analize gena između HBF astmatičara i neastmatičara uzgojenih u 3D kulturama nije pokazala razliku u sadržaju ključnih gena povezanih s pojačanim prijelazom fibroblasta u miofibroblaste. Međutim, stimulacijom HBF stanica s TGF- $\beta$ 1, SMAD2/3 signalni put bio je značajno istaknutiji u slučaju 3D uzgojenih HBF izvedenih iz astmatičara. TGF- $\beta$ 1 uzrokovao je jasne razlike između ekspresije gena u ispitivanim skupinama. Ovi rezultati jasno pokazuju da HBF astmatičara ugrađeni u 3D kolagensku matricu prikazuju prijenos signala na temelju fosforilacije SMAD2/3 nakon stimulacije s TGF- $\beta$ 1, što se ne može reći za HBF



dobivene od zdravih pacijenata. Zaključeno je da TGF- $\beta$ 1 pospješuje proces prijelaza fibroblasta u miofibroblaste, a fibroblasti astmatičara proizvode više proteina izvanstaničnog matriksa u usporedbi s neastmatičarima. Uzrok tome je upravo povećana aktivacija puta TGF- $\beta$ /SMAD2/3, koji je kanonski put kroz koji dolazi do indukcije prijelaza fibroblasta u miofibroblaste (Wnuk i sur., 2020).



Slika 5: Prikaz mikroskopskih fotografija uzgojenih HBF stanica astmatičara i zdravih ljudi dobivenih diferencijalnim interferencijskim kontrastom, jezgre stanica su obojene plavom bojom. Donji niz fotografija pokazuje signal SMAD2/3; mišje monoklonsko anti-SMAD2/3 protutijelo konjugirano je s AlexaFluor-647 i korišteno je za izravnu imunodetekciju antitijela kako bi se potvrdila nuklearna translokacija SMAD2/3 proteina. Povećanje nuklearne razine p-SMAD2/3 nakon tretiranja stanica s TGF- $\beta$ 1 značajno je izraženije u slučaju HBF dobivenih od pacijenata s dijagnosticiranom astmom (zadnje desno polje) (preuzeto i preoblikovano prema Wnuk i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača).

#### 4.7.4. Cistična fibroza

Cistična fibroza je genetska autosomno-recesivna bolest uzrokovana mutacijama u *CFTR* genu koji kodira za regulator transmembranske provodljivosti cistične fibroze (CFTR, engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Wong i sur., 2012). CFTR protein primarno djeluje kao kloridni kanal koji regulira prijenos klorida i vode preko apikalne membrane

epitelnih stanica. Utječe na više organa, uključujući pluća, ali ima i druge funkcije, kao što su izlučivanje bikarbonata i inhibicija transporta natrija (Ratjen i sur., 2015). Unatoč tome što je to monogenetska bolest, uočeno je oko 2000 različitih mutacija što dovodi do različitih fenotipova bolesti. Delecija fenilalanina na poziciji 508 (*ΔF508*) je mutacija koja se najčešće susreće i uočena je u oko 70 % oboljelih (Ratjen i sur., 2015). Iako je cistična fibroza višeorganski poremećaj, najviše su pogođena pluća. Gubitak CFTR na apikalnoj strani plućnog epitela uzrokuje neuravnotežen transport iona i tekućina kroz stanice što dovodi do kronične upale i ponavljajućih bakterijskih infekcija. Respiratorno zatajenje predstavlja primarni uzrok smrti i morbiditeta (Baldassi i sur., 2021).

Genetski modificirani glodavci, koji nose jednu ili neke od 2000 mogućih *CFTR* mutacija koje mogu rezultirati cističnom fibrozom, korišteni su za modeliranje ove bolesti kod ljudi. Razvoj mišjeg modela pomogao je identificirati mnoge karakteristike cistične fibroze. Iako ti modeli nose mutacije za koje je poznato da su povezane s pojavom bolesti kod ljudi, fenotipovi bolesti kod miševa variraju u težini i patologiji. Te se razlike pripisuju nedostatku specifičnih tipova stanica, receptora i medijatora uključenih u cističnu fibrozu kod glodavaca (Bosáková i sur., 2022). *Ex vivo* uzorci dobiveni iz pojedinaca, poput ljudskog bronhijalnog epitela, ljudskog nosnog epitela, intestinalnih organoida te nazalnih i plućnih sferoida nalikuju morfologiji i funkcionalnosti epitela roditeljskih organa i odražavaju kompletnu genetsku pozadinu. Čini se da su stanice nosnog epitela dobar surogat, a prikupljaju se minimalno invazivnim postupcima kao što je četkanje nosa. Trenutačni zlatni standard za modeliranje plućnog epitela zahvaćenog cističnom fibrozom jest *ALI* kultura ljudskih nazalnih epitelnih stanica (Conti i sur., 2022). *ALI* sustavi idealni su za uzgoj epitelnih stanica *in vitro*, budući da omogućuju proizvodnju diferenciranog epitela dišnih puteva, uključujući glavne značajke pronađene *in vivo*, osobito u smislu stanične diferencijacije, izlučivanja sluzi i funkcije barijere (Baldassi i sur., 2021). Posebno se Calu-3 stanice naširoko koriste zbog svoje visoke transepitelne otpornosti, izlučivanja sluzi i visoke ekspresije CFTR proteina.

Još jedno tkivo koje je reprezentativno za cističnu fibrozu je gastrointestinalni trakt koji je *in utero* ili rano nakon rođenja zahvaćen bolestima kao što su mekonijski ileus i insuficijencija gušterače (Conti i sur., 2022). Za izradu crijevnih organoida potrebni su uzorci rektalnog tkiva dobiveni postupkom biopsije. Uzgajaju se iz fragmenata crijevnih kriпти izoliranih nakon postupka rektalne biopsije koja uzrokuje samo ograničenu nelagodu pacijentima jer je bezbolna, obično je pacijenti dobro prihvaćaju i izvediva je u ljudi svih dobnih skupina (uključujući novorođenčad) bez potrebe za anestezijom/sedacijom. Budući da su organoidi napravljeni od

matičnih stanica, sadrže iste mutacije kao i osoba od koje su dobivene biopsije. Organoidi se koriste kako bi se otkrilo na koje mutacije lijekovi imaju pozitivan učinak ([www.hitcf.org](http://www.hitcf.org)). Intestinalni organoidi ostaju najnapredniji trodimenzionalni *in vitro* model za cističnu fibrozu do danas. Važno je napomenuti da CFTR predstavlja dominantni kanal odgovoran za izlučivanje iona i tekućine u gastrointestinalnim stanicama, što intestinalne organoide također čini vrijednim modelima za istraživanje funkcije i modulacije CFTR-a (Conti i sur., 2022).

Koriste se i ko-kulture kao modeli koji su pridonijeli razumijevanju jednog važnog aspekta cistične fibroze - bakterijske infekcije dišnih puteva. *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* su bakterijski sojevi koji uzrokuju plućne infekcije kod pacijenata s cističnom fibrozom. Nekoliko je studija pokazalo da je moguće kultivirati ove sojeve na apikalnoj strani polariziranih epitelnih stanica pacijenta uzgojenih na *ALI* modelu kako bi se promatrao upalni odgovor, proces infekcije i stvaranje biofilma. *ALI* ko-kulture su usvojene za procjenu sposobnosti antibiotika, kombiniranih terapija i antimikrobnih peptida da spriječe bakterijsku infekciju (Baldassi i sur., 2021).

Organoidi pluća su uspješno korišteni za istraživanje patogeneze cistične fibroze i objavljeni su protokoli za generiranje progenitorskih stanica pluća specifičnih za bolest iz pluripotentnih matičnih stanica pacijenata. Wong i sur. (2012) proveli su studiju u kojoj su epitelne stanice pluća izvedene iz pluripotentnih matičnih stanica korištene za testiranje spoja nazvanog "korektor" koji može obnoviti funkciju i promet mutiranog CFTR proteina na membrani. Tretman "korektorom" stanica s  $\Delta F508$  mutacijom rezultirao je pojačanom lokalizacijom proteina CFTR na membrani. Ovaj pristup pruža mogućnost testiranja lijekova za personaliziranu medicinu i mogući budući razvoj regenerativne medicine za plućne poremećaje. Glavna prepreka liječenju cistične fibroze je predviđanje odgovora pacijenata na lijekove zbog genetske složenosti i heterogenosti. Terapije CFTR modulatora pozitivno su promijenile kvalitetu života bolesnika, posebice onih koji su s njihovom primjenom počeli na početku bolesti (Conti i sur., 2022). Djeluju ili kao pojačivači CFTR-a otvaranjem kanala prisutnih na površini stanice ili kao korektori CFTR-a poboljšavanjem transporta proteina do stanične membrane (Baldassi i sur., 2021). Visoko učinkoviti lijekovi koji moduliraju defektni protein kodiran *CFTR* genom revolucionarizirali su terapiju cistične fibroze. Pretkliničko testiranje lijekova na kulturi stanica ljudskog nosnog epitela i trodimenzionalnih organoida ljudskog crijeva koristi se za rješavanje varijacija u odgovoru na lijekove specifičnih za pacijenta i za optimizaciju individualnog liječenja za osobe s cističnom fibrozom. (Birimberg-Schwartz i sur., 2023). Razvoj novih terapija donio je prednosti u sprječavanju komplikacija bolesti,

poboljšanju dobrobiti pojedinca i povećanju stope preživljavanja. Pedijatrijska smrtnost je smanjena, a preživljavanje pacijenata se poboljšalo do razine da mnogi pojedinci danas žive i do 40-50 godina (Conti i sur., 2022).

#### 4.7.5. COVID-19

Respiratorne virusne infekcije, uključujući infekciju virusom SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), među najčešćim su bolestima i uzrocima morbiditeta i mortaliteta. Zbog teških učinaka na zdravlje, nužna je potreba za novim alatima za proučavanje patogeneze respiratornih virusa kao i za testiranje novih antivirusnih lijekova i cjepiva (Harb i sur., 2021). Tijekom pandemije bolesti COVID-19, svjedočili smo kako jedan virus može utjecati na svakodnevni život i osakatiti ekonomiju i zdravstvo cijeloga svijeta. Ozbiljan utjecaj koji ima na zdravlje dodatno naglašava važnost razvoja tehnologija za razmišljanja učinaka i infektivnosti ovog virusa i istraživanje novih terapijskih meta (Harb i sur., 2021). Od početka pandemije, mnogo je truda uloženo u proučavanje virusa SARS-CoV-2, mogućih opcija liječenja i razvoja cjepiva za borbu protiv njegovog učinka. U tu svrhu, pluripotentne plućne stanice i organoidi debelog crijeva razvijeni su kako bi se bolje razumjelo napredovanje bolesti te kako bi se istražili mogući lijekovi učinkoviti u sprječavanju ulaska virusa u stanice domaćina jer je proučavanje na životinjama bilo ograničeno (Krüger i sur., 2021). Miševima nedostaje ACE2 (engl. *angiotensin-converting enzyme 2*) receptor na koje se ovaj virus veže i izaziva infekciju domaćina. To je u početku dramatično ograničavalo njihovu primjenjivost u ovom području. Iako je nedavno objavljen razvoj mišjeg modela koji eksprimira ljudski ACE2 receptor, još uvijek nije jasno oponaša li odgovor miševa na virus onaj kod ljudi (Bosáková i sur., 2022).

Uspostavljeno je nekoliko *in vitro* modela plućnih infekcija temeljenih na organoidima koji su pružili uvid u temeljne interakcije između domaćina i patogena na staničnoj i molekularnoj razini. Pandemija bolesti COVID-19 povećala je potražnju i fokus na *in vitro* modele ljudskog plućnog tkiva kako bi se olakšala istraživanja patologije bolesti i testiranje lijekova ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)). Napredak u 3D bioprintingu privukao je pozornost jer je omogućio proizvodnju ovih modela tkiva *in vitro* (Harb i sur., 2021).

*ALI* kultura primarnih stanica ljudskih dišnih puteva jedinstveno je prikladna kao model za *in vitro* studije infekcije. To je zbog sposobnosti *ALI* kultura da vjerno rekapituliraju ključne

karakteristike *in vivo* dišnog puta. *ALI* ljudske kulture dišnih puteva omogućuju učinkovitu infekciju uzgojenih stanica i korištene su za modeliranje različitih mehanizama virusne patogeneze. To uključuje istraživanje interakcija proteina tijekom unutarstanične replikacije, čimbenika koji utječu na ulazak virusa u stanice i kinetike infekcije. Korisnost *ALI* kultura za proučavanje virusnih infekcija predstavlja vrijedan alat za razvoj antivirusnih terapijskih pristupa - neutralizacija virusa monoklonskim antitijelima je testirana u ovom modelu ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)). Znanstvenici su uspjeli brzo izolirati virus iz bronha pacijenata koji boluju od bolesti COVID-19. Proučavali su njegove biološke karakteristike koristeći *ALI* modele primarnih ljudskih bronhijalnih epitelnih stanica (Baldassi i sur., 2021). Kulture ljudskih stanica velikih i malih dišnih puteva uzgojene na *ALI* modelu pokazuju obilnu ekspresiju ACE2 receptora na koje se veže sam virus i daju fiziološki relevantan model za ispitivanje ACE2 kao mete za antivirusnu terapiju protiv bolesti COVID-19 ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)). *ALI* kulture predstavljale su vrijedan i visokoučinkovit alat za brzo dobivanje informacija o infekciji, replikaciji i patogenezi ovog virusa (Baldassi i sur., 2021).

Han i sur. (2022) razvili su organoide pluća i debelog crijeva izvedene iz ljudskih pluripotentnih matičnih stanica koristeći 3D kulture kako bi bolje razumjeli mehanizam bolesti COVID-19 i identificirali kandidate lijekova koji mogu blokirati ulaz SARS-CoV-2 u stanice domaćina. Pokazali su da su plućni organoidi bili permisivni za SARS-CoV-2 kao što se i očekivalo budući da virus primarno cilja na respiratorni trakt, a to je bilo popraćeno snažnom proizvodnjom kemokina, što je vrlo slično onome što se događa *in vivo* u tijelu ( Han i sur., 2022).

Ljudski 3D modeli korišteni su za proučavanje lijekova odobrenih od strane FDA. Za nekoliko lijekova, uključujući imatinib, mikofenolnu kiselinu i kinakrin dihidroklorid, pokazalo se da inhibiraju ulazak SARS-CoV-2 u organoide pluća i debelog crijeva (Rijsbergen i sur., 2021). Istraživački timovi u Njemačkoj također su razvili ljudske crijevne organoide izvedene iz pluripotentnih matičnih stanica za proučavanje patogeneze SARS-CoV-2 i njegove inhibicije remdesivirom, prvim lijekom za liječenje bolesti COVID-19 koji je odobrila FDA (Krüger i sur., 2021). Većina tipova stanica crijevnih organoida zaražena je virusom SARS-CoV-2, s iznimkom vrčastih stanica jer im nedostaje ekspresija ACE2 receptora. Još važnije, remdesivir je smanjio SARS-CoV-2 infekciju crijevnih organoida za 86 % pri koncentraciji od 0,5  $\mu\text{M}$  i gotovo inhibirao infekciju pri 5  $\mu\text{M}$ , što je ukazalo na remdesivir kao uspješan lijek protiv SARS-CoV-2 infekcije crijeva (Mulay i sur., 2021). U drugoj studiji, zaraženi organoidi su liječeni fiziološki relevantnim koncentracijama lopinavira, nelfinavira i remdesivira. Iako su lopinavir i nelfinavir značajno smanjili titar virusa, replikacija virusa SARS-CoV-2 nije

zaustavljena. Zanimljivo je da je remdesivir potpuno inhibirao replikaciju virusa u zaraženim organoidima (Ebisudani i sur., 2021).

Također je razvijen sustav za uzgoj organoida izvedenih iz jedne alveolarne epitelne stanice tipa II (AT2) odrasle osobe. Stvoreni organoidi podržali su diferencijaciju AT2 stanica u AT1 stanice koje zajedno tvore epitel ljudskih pluća u kojem AT2 stanice proizvode proteine plućnog surfaktanta, a AT1 stanice pokrivaju većinu površine alveole i obavljaju funkciju izmjene plinova (Bosáková i sur., 2022). Ovi organoidi također su korišteni za modeliranje ljudske infekcije virusom SARS-CoV-2. U studiji su stvoreni distalni plućni organoidi s apikalnim polaritetom kako bi se izložili ACE2 receptori na vanjskoj površini, olakšavajući infekciju AT2 stanica i identificirajući *Clara* stanice (necilijarne bronhijalne sekretorne stanice) kao metu virusa. Oko 10 % organoida izvedenih iz AT2 i 10 % organoida izvedenih iz bazalnih stanica zaraženo je virusom SARS-CoV-2. Ovi rezultati pokazuju da su AT2 stanice izravno zaražene SARS-CoV-2 i da su *Clara* stanice ciljna meta virusa (Salahudeen i sur., 2020).

Organoidi su uspješno korišteni kao modeli ljudskih bolesti uzrokovanih infekcijama virusa kao što je SARS-CoV-2. Ovi modeli predstavljaju učinkovite i relativno jeftine alate za pretklinička i klinička ispitivanja potencijalnih strategija liječenja (Bosáková i sur., 2022). Implementacijom takvih trodimenzionalnih *in vitro* modela, znanstvenici će moći dobiti poboljšane uvide u interakcije između virusa i domaćina te dobiti pouzdanije i reproducibilnije rezultate u vezi s antivirusnom terapijom čime će se pokusi na životinjama svesti na minimum (Baldassi i sur., 2021).

## 5. ZAKLJUČCI

U posljednjim desetljećima, napredak u području medicine i biotehnologije omogućio je razvoj inovativnih tehnika za istraživanje i liječenje raznih bolesti. Jedno od područja koje je doživjelo značajan napredak jest istraživanje plućnih bolesti, a 3D stanične kulture su postale ključni alat u istraživanju ovih patoloških stanja. Iz ovog preglednog diplomskog rada možemo zaključiti sljedeće:

- Primjena 3D staničnih kultura u istraživanju plućnih bolesti otvara nove perspektive za razumijevanje, dijagnostiku i liječenje ovih kompleksnih bolesti.
- Korištenjem 3D staničnih kultura, znanstvenici su uspjeli rekonstruirati složene strukture pluća poput alveola i bronhijalnih cijevi čime se promatraju interakcije između različitih tipova stanica u plućima i otkrivaju kako poremećaji u tim interakcijama mogu dovesti do bolesti.
- Stvaraju se uvjeti koji nalikuju plućnom okruženju pa se izlaganjem stanica pluća raznim štetnim čimbenicima poput dima cigareta, toksina, virusa ili alergena proučavaju reakcija stanica pluća na ove štetne utjecaje i razumijevanje mehanizama bolesti kao što su astma ili KOPB.
- Još jedna prednost 3D kultura u istraživanju plućnih bolesti jest ispitivanje lijekova na plućnim stanicama kako bi se utvrdila njihova sigurnost i učinkovitost što je posebno važno za razvoj personalizirane medicine, gdje se terapije prilagođavaju individualnim karakteristikama pacijenta.
- Korištenje organoida pluća za testiranje sigurnosti i učinkovitosti potencijalnih lijekova umjesto dugotrajnih i skupih kliničkih ispitivanja može uvelike doprinijeti bržem i jeftinijem razvoju novih lijekova.
- 3D stanične kulture također imaju potencijal za razvoj novih tehnika regenerativne medicine. Kombinirajući matične stanice i biomaterijale, znanstvenici mogu stvoriti personalizirane 3D modele pluća koji se mogu koristiti za popravak oštećenih plućnih tkiva. Ova inovativna područja istraživanja obećavaju nove mogućnosti za liječenje bolesti poput cistične fibroze ili plućnih ozljeda.
- Tumorski modeli razvijeni su kako bi pružili uvid u rast tumora, invaziju, remodeliranje matriksa ili isporuku lijeka. Mnoge studije tumora pluća koriste sferoidne modele za terapijski probir gdje se nakupine stanica podvrgavaju samosastavljanju kako bi formirale održive, 3D strukture slične tumorima.

- S povećanom pojavom novih virusnih respiratornih patogena i razornim učincima koje oni imaju, posebno s najnovijom pandemijom bolesti COVID-19, postoji hitna potreba za proizvodnjom modela respiratornog tkiva koji rekapituliraju ljudska pluća.



## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

16HBE14o- - linija epitelnih stanica ljudskog bronha

A549 - stanična linija raka pluća nemalih stanica

ACE2 - angiotenzin konvertirajući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme 2*)

ALI - granica medij-zrak (engl. *air-liquid interface*)

ARDS - sindrom akutnog respiratornog distresa (engl. *acute respiratory distress syndrome*)

BEAS-2B - humana netumorogena stanična linija plućnog epitela izvedena iz ljudskog plućnog tkiva

BRAF - B-Raf protoonkogen (engl. *B-Raf protooncogene*)

Calu-3 - stanična linija raka pluća nemalih stanica

CFTR - regulator transmembranske provodljivosti cistične fibroze (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EGFR - receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

FDA - Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

H441 - stanice izolirane iz perikardijalne tekućine pacijenta s papilarnim adenokarcinomom pluća

HBF - ljudski bronhijalnih fibroblasti (engl. *human bronchial fibroblasts*)

HGF - čimbenik rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*)

HN12 - stanice razvijene su iz tumorskih stanica čovjeka s metastatskim planocelularnim karcinomom glave i vrata

IgA - imunoglobulin A

IL-1 $\beta$  - interleukin-1 $\beta$

IL-6 - interleukin-6

IL-8 - interleukin-8

KOPB - kronična opstruktivska plućna bolest (engl. *chronic obstructive lung disease*)

KRAS - Kirstenov virus štakorskog sarkoma (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*)

MMP-9 - engl. *matrix metalloproteinase 9*

NSCLC - rak pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*)

PD-1 - engl. *programmed cell death protein 1*

PDGF - trombocitni čimbenik rasta (engl. *platelet-derived growth factor*)

RNA - ribonukleinska kiselina ( engl. *ribonucleic acid*)

SCLC - rak pluća malih stanica (engl. *small cell lung cancer*)

SeedE - matrica optimizirana za dugotrajni rast stanica

SMAD - engl. *Suppressor of Mothers against decapentaplegic*

TGF- $\beta$  - transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* )

TNF- $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

TP53 - engl. *tumor protein P53*

VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

$\Delta$ F508 - delecija fenilalanina na poziciji 508

## 7. LITERATURA

Air-Liquid Interface Culture For Respiratory Research, 2019., <https://www.stemcell.com/>, pristupljeno 7.6.2023.

Amatngalim GD, Schrupf JA, Henic A, Dronkers E, Verhoosel RM, Ordonez SR, Haagsman HP, Fuentes ME, Sridhar S, Aarbiou J, Janssen RAJ, Lekkerkerker AN, Hiemstra PS. Antibacterial Defense of Human Airway Epithelial Cells from Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients Induced by Acute Exposure to Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Modulation by Cigarette Smoke. *J Innate Immun*, 2017, 9, 359-374.

Aydin M, Naumova EA, Bellm A, Behrendt AK, Giachero F, Bahlmann N, Zhang W, Wirth S, Paulsen F, Arnold WH, Ehrhardt A. From Submerged Cultures to 3D Cell Culture Models: Evolution of Nasal Epithelial Cells in Asthma Research and Virus Infection. *Viruses*, 2021, 13, 387.

Baldassi D, Gabold B, Merkel O. Air-liquid interface cultures of the healthy and diseased human respiratory tract: promises, challenges and future directions. *Adv Nanobiomed Res*, 2021, 1, 2000111.

Bar K, Litera-Bar M, Sozańska B. Bacterial Microbiota of Asthmatic Children and Preschool Wheezers' Airways-What Do We Know? *Microorganisms*, 2023, 11, 1154.

Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 6225.

Birimberg-Schwartz L, Ip W, Bartlett C, Avolio J, Vonk AM, Gunawardena T, Du K, Esmaeili M, Beekman JM, Rommens J, Strug L, Bear CE, Moraes TJ, Gonska T. Validating organoid-derived human intestinal monolayers for personalized therapy in cystic fibrosis. *Life Sci Alliance*, 2023, 6, e202201857.

Bosáková V, De Zuani M, Sládková L, Garlíková Z, Jose SS, Zelante T, Hortová Kohoutková M, Frič J. Lung Organoids-The Ultimate Tool to Dissect Pulmonary Diseases? *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10, 899368.

Bradarić N. (2020) Diferencijacija ljudskih endocervikalnih stanica uzgojenih u 3D staničnoj kulturi. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*, 2013, 18, 240-249.

Capes-Davis A, Freshney RI. Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. Wiley-Blackwell, 2021, str. 3-12.

Chen Q, Wang Y. The application of three-dimensional cell culture in clinical medicine. *Biotechnol Lett*, 2020, 42, 2071-2082.

Conti J, Sorio C, Melotti P. Organoid Technology and Its Role for Theratyping Applications in Cystic Fibrosis. *Children (Basel)*, 2022, 10, 4.

Cooper GM i Hausman RE. Stanica: molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 29-33.

Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*, 2017, 32, 266-277.

Ebisudani T, Sugimoto S, Haga K, Mitsuishi A, Takai-Todaka R, Fujii M, Toshimitsu K, Hamamoto J, Sugihara K, Hishida T, Asamura H, Fukunaga K, Yasuda H, Katayama K, Sato T. Direct derivation of human alveolospheres for SARS-CoV-2 infection modeling and drug screening. *Cell Rep*, 2021, 35, 109218.

Hai J, Zhang H, Zhou J, Wu Z, Chen T, Papadopoulos E, Dowling CM, Pyon V, Pan Y, Liu JB, Bronson RT, Silver H, Lizotte PH, Deng J, Campbell JD, Sholl LM, Ng C, Tsao MS, Thakurdin C, Bass AJ, Wong KK. Generation of Genetically Engineered Mouse Lung Organoid Models for Squamous Cell Lung Cancers Allows for the Study of Combinatorial Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2020, 26, 3431-3442.

Han Y, Yang L, Lacko LA, Chen S. Human organoid models to study SARS-CoV-2 infection. *Nature Methods*, 2022, 19, 418-428.

Harb A, Fakhreddine M, Zaraket H, Saleh FA. Three-Dimensional Cell Culture Models to Study Respiratory Virus Infections Including COVID-19. *Biomimetics (Basel)*, 2021, 7, 3.

Haycock JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol*, 2011, 695, 1-15.

Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*. 2010, 328, 1662-1668.

Janić, I. (2019) Modeliranje staničnih sferoida različitim uzgojnim metodama in vitro. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*, 2020, 7, 33.

Kamatar A, Gunay G, Acar H. Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids. *Polymers (Basel)*, 2020, 12, 2506.

Kang D, Park JA, Kim W, Kim S, Lee HR, Kim WJ, Yoo JY, Jung S. All-Inkjet-Printed 3D Alveolar Barrier Model with Physiologically Relevant Microarchitecture. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8, 2004990.

Kim M, Mun H, Sung CO, Cho EJ, Jeon HJ, Chun SM, Jung DJ, Shin TH, Jeong GS, Kim DK, Choi EK, Jeong SY, Taylor AM, Jain S, Meyerson M, Jang SJ. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nat Commun*, 2019, 10, 3991.

Kong A, Mehanna H. WEE1 Inhibitor: Clinical Development. *Curr Oncol Rep*, 2021, 23, 107.

Krüger J, Groß R, Conzelmann C, Müller JA, Koepke L, Sparrer KMJ, Weil T, Schütz D, Seufferlein T, Barth TFE, Stenger S, Heller S, Münch J, Kleger A. Drug Inhibition of SARS-CoV-2 Replication in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Organoids. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 11, 935-948.

Ladjemi MZ, Lecocq M, Weynand B, Bowen H, Gould HJ, Van Snick J, Detry B, Pilette C. Increased IgA production by B-cells in COPD via lung epithelial interleukin-6 and TACI pathways. *Eur Respir J*, 2015, 45, 980-993.

Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol*, 2018, 9, 6.

Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008, 14, 61-86.

Lu T, Yang X, Huang Y, Zhao M, Li M, Ma K, Yin J, Zhan C, Wang Q. Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades. *Cancer Manag Res*, 2019, 11, 943-953.

Lung Cancer Organoid Biobank, <https://www.sigmaaldrich.com/>, pristupljeno 20.6.2023.

Marin L, Traini D, Bebawy M, Colombo P, Buttini F, Haghi M, Ong HX, Young P. Multiple dosing of simvastatin inhibits airway mucus production of epithelial cells: implications in the treatment of chronic obstructive airway pathologies. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 84, 566-572.

Movia D, Prina-Mello A. A Method for Culturing 3D Tumoroids of Lung Adenocarcinoma Cells at the Air-Liquid Interface. *Methods Mol Biol*, 2023, 2645, 173-178.

Mulay A, Konda B, Garcia G Jr, Yao C, Beil S, Villalba JM, Koziol C, Sen C, Purkayastha A, Kolls JK, Pociask DA, Pessina P, de Aja JS, Garcia-de-Alba C, Kim CF, Gomperts B, Arumugaswami V, Stripp BR. SARS-CoV-2 infection of primary human lung epithelium for COVID-19 modeling and drug discovery. *Cell Rep*, 2021, 35, 109055.

Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020.-2024., Ministarstvo zdravstva, 2020., <https://zdravlje.gov.hr>, pristupljeno 3.6.2023.

Nguyen T, Ahsan F. An Overview of Organ-on-a-Chip Models for Recapitulating Human Pulmonary Vascular Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1413, 265-272.

Rabe KF, Watz H. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2017, 389, 1931-1940.

Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Radošević K. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 2016, 11, 169-175.

Rak pluća, 2017., <https://www.onkologija.hr/>, pristupljeno 3.6.2023.

Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL, Bush A. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1, 15010.

Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*, 2015, 230, 16-26.

Rijsbergen LC, van Dijk LLA, Engel MFM, de Vries RD, de Swart RL. *In Vitro* Modelling of Respiratory Virus Infections in Human Airway Epithelial Cells - A Systematic Review. *Front Immunol*, 2021, 12, 683002.

Ritchie AI, Wedzicha JA. Definition, Causes, Pathogenesis, and Consequences of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. *Clin Chest Med*, 2020, 41, 421-438.

Salahudeen AA, Choi SS, Rustagi A, Zhu J, van Unen V, de la O SM, Flynn RA, Margalef-Català M, Santos AJM, Ju J, Batish A, Usui T, Zheng GXY, Edwards CE, Wagar LE, Luca V, Anchang B, Nagendran M, Nguyen K, Hart DJ, Terry JM, Belgrader P, Ziraldo SB, Mikkelsen TS, Harbury PB, Glenn JS, Garcia KC, Davis MM, Baric RS, Sabatti C, Amieva MR, Blish CA, Desai TJ, Kuo CJ. Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids. *Nature*, 2020, 588, 670-675.

Silva S, Bicker J, Falcão A, Fortuna A. Air-liquid interface (ALI) impact on different respiratory cell cultures. *Eur J Pharm Biopharm*, 2023, 184, 62-82.

Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20, 379-388.

Spheroids, Application of spheroids for cancer research and drug screening, <https://www.moleculardevices.com/>, pristupljeno 20.6.2023.

Studying COVID-19 with Air-Liquid Interface Cultures, <https://www.stemcell.com/>, pristupljeno 3.6.2023.

Using organoids to study early-stage lung cancer, 2020., <https://hsci.harvard.edu/>, pristupljeno 24.6.2023.

van Os L, Yeoh J, Witz G, Ferrari D, Krebs P, Chandorkar Y, Zeinali S, Sengupta A, Guenat OT. Immune cell extravasation in an organ-on-chip to model lung inflammation. *Eur J Pharm Sci*, 2023, 187, 106485.

What is the use of organoids?, <https://www.hitcf.org/>, pristupljeno 15.6.2023.

Wnuk D, Lasota S, Paw M, Madeja Z, Michalik M. Fibroblast to myofibroblast transition is enhanced in asthma-derived fibroblasts in comparison to fibroblasts derived from non-asthmatic patients in 3D in vitro cultures due to Smad2/3 signalling. *Acta Biochim Po*, 2020, 67, 441-448.

Wong AP, Bear CE, Chin S, Pasceri P, Thompson TO, Huan LJ, Ratjen F, Ellis J, Rossant J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nat Biotechnol*, 2012, 30, 876-882.

Xiong Y, He L, Shay C, Lang L, Loveless J, Yu J, Chemmalakuzhy R, Jiang H, Liu M, Teng Y. Nck-associated protein 1 associates with HSP90 to drive metastasis in human non-small-cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38, 122.

Xue J, Li Z, Li X, Hua C, Shang P, Zhao J, Liu K, Xie F. Evaluation of cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammation in BEAS-2B cells based on a lung microfluidic chip. *Food Chem Toxicol*, 2023, 176, 113787.

Yamasaki A. Editorial: Airway remodeling in asthma-what is new? *Front Allergy*, 2023, 4, 1129840.

Zeng X, Ma Q, Li XK, You LT, Li J, Fu X, You FM, Ren YF. Patient-derived organoids of lung cancer based on organoids-on-a-chip: enhancing clinical and translational applications. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11, 1205157.

Zscheppang K, Berg J, Hedtrich S, Verheyen L, Wagner DE, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC. Human Pulmonary 3D Models For Translational Research. *Biotechnol J*, 2018, 131700341.



## 8. SAŽETAK / SUMMARY

U posljednjim desetljećima, napredak u području medicine i biotehnologije omogućio je razvoj inovativnih tehnika za istraživanje i liječenje raznih bolesti. Jedno od područja koje je doživjelo značajan napredak jest istraživanje plućnih bolesti, a trodimenzionalne (3D) stanične kulture su postale ključni alat u istraživanju ovih patoloških stanja. Primjena 3D staničnih kultura u istraživanju plućnih bolesti otvara nove perspektive za razumijevanje, dijagnostiku i liječenje ovih kompleksnih bolesti. Ovi napredni *in vitro* modeli omogućuju znanstvenicima bolje modeliranje pluća u laboratorijskim uvjetima, razumijevanje patogeneze i ispitivanje potencijalnih terapijskih pristupa. 3D stanične kulture uvelike su korištene u širokom rasponu, uključujući istraživanje napredovanje raka, razvoj tkiva i metabolizam lijekova. Tradicionalni dvodimenzionalni (2D) sistemi stanične kulture imaju ograničenja u oponašanju kompleksne 3D okoline plućnog tkiva. Nasuprot tome, 3D stanične kulture pružaju model koji je fiziološki relevantniji za proučavanje plućnih bolesti, a budućnost istraživanja plućnih bolesti uvelike ovisi o daljnjem razvoju 3D staničnih kultura.

In recent decades, progress in the field of medicine and biotechnology has enabled the development of innovative techniques for research and treatment of various diseases. One of the areas that has progressed significantly is the research of lung diseases, and three-dimensional (3D) cell cultures have become a key tool in the research of these pathological conditions. The application of 3D cell cultures in the research of lung diseases opens new perspectives for the understanding, diagnosis and treatment of these complex diseases. These advanced *in vitro* models allow scientists to model the lung in laboratory conditions, understand the pathogenesis and test potential therapeutic approaches. The 3D cell cultures have been used extensively over a wide range of biological processes, including cancer progression, tissue development, and drug metabolism. Traditional two-dimensional (2D) cell culture systems have limitations in mimicking the complex 3D environment of lung tissue. In contrast, 3D cell culture systems provide a more physiologically relevant model to study pulmonary diseases and the future of lung disease research depends largely on the further development of 3D cell cultures.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### PRIMJENA 3D KULTURA STANICA U ISTRAŽIVANJU PLUĆNIH BOLESTI

Antonija Kovačić

#### SAŽETAK

U posljednjim desetljećima, napredak u području medicine i biotehnologije omogućio je razvoj inovativnih tehnika za istraživanje i liječenje raznih bolesti. Jedno od područja koje je doživjelo značajan napredak jest istraživanje plućnih bolesti, a trodimenzionalne (3D) stanične kulture su postale ključni alat u istraživanju ovih patoloških stanja. Primjena 3D staničnih kultura u istraživanju plućnih bolesti otvara nove perspektive za razumijevanje, dijagnostiku i liječenje ovih kompleksnih bolesti. Ovi napredni *in vitro* modeli omogućuju znanstvenicima bolje modeliranje pluća u laboratorijskim uvjetima, razumijevanje patogeneze i ispitivanje potencijalnih terapijskih pristupa. 3D stanične kulture uvelike su korištene u širokom rasponu, uključujući istraživanje napredovanje raka, razvoj tkiva i metabolizam lijekova. Tradicionalni dvodimenzionalni (2D) sistemi stanične kulture imaju ograničenja u oponašanju kompleksne 3D okoline plućnog tkiva. Nasuprot tome, 3D stanične kulture pružaju model koji je fiziološki relevantniji za proučavanje plućnih bolesti, a budućnost istraživanja plućnih bolesti uvelike ovisi o daljnjem razvoju 3D staničnih kultura.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 5 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 60 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: 3D stanične kulture, 2D stanične kulture, organoidi, sferoidi, granica medij-zrak, pluća na čipu, plućne bolesti

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj, 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of medical biochemistry and hematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### THE APPLICATION OF 3D CELL CULTURES IN PULMONARY DISEASE RESEARCH

**Antonija Kovačić**

#### SUMMARY

In recent decades, progress in the field of medicine and biotechnology has enabled the development of innovative techniques for research and treatment of various diseases. One of the areas that has progressed significantly is the research of lung diseases, and three-dimensional (3D) cell cultures have become a key tool in the research of these pathological conditions. The application of 3D cell cultures in the research of lung diseases opens new perspectives for the understanding, diagnosis and treatment of these complex diseases. These advanced *in vitro* models allow scientists to model the lung in laboratory conditions, understand the pathogenesis and test potential therapeutic approaches. The 3D cell cultures have been used extensively over a wide range of biological processes, including cancer progression, tissue development, and drug metabolism. Traditional two-dimensional (2D) cell culture systems have limitations in mimicking the complex 3D environment of lung tissue. In contrast, 3D cell culture systems provide a more physiologically relevant model to study pulmonary diseases and the future of lung disease research depends largely on the further development of 3D cell cultures.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 5 figures, 1 table and 60 references. Original is in Croatian language.

Keywords: 3D cell culture, 2D cell culture, organoids, spheroids, air-liquid interface, lung on a chip, pulmonary diseases

Mentor: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** Postdoctoral Researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2023.

